

MARCELO LUIZ GEHLEN

**ESTUDO DA PERMEABILIDADE VASCULAR CORNEANA AGUDA EM
COELHOS SUBMETIDOS À QUEIMADURA QUÍMICA E INJEÇÃO
SUBCONJUNTIVAL DE AGENTES PRÓ E ANTIINFLAMATÓRIOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para a obtenção do grau acadêmico de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Moreira

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

CURITIBA

2005

Gehlen, Marcelo Luiz
Estudo da reação inflamatória corneana aguda em modelo experimental após
Queimadura química e injeção subconjuntival. Curitiba, 2005. f. 86.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Moreira.
Tese (Doutorado)/Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná.

1. Reação Inflamatória Comeana Aguda. 2. Células de Membrana Amniótica. 3.
Meio de Conservação. 4. Azul de Evans. 5. Sulfato de Condroitina.

I. Título



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

DECLARAÇÃO

Declaro, que o Doutor **MARCELO LUIZ GENLEN**, completou os requisitos necessários para obtenção do Grau Acadêmico de Doutor em Clínica Cirúrgica, ofertado pela Universidade Federal do Paraná.

Para obtê-los, concluiu os créditos didáticos previstos no Regimento do Programa e apresentou sua tese sob título: "ESTUDO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA CORNEANA AGUDA EM MODELO EXPERIMENTAL APÓS QUEIMADURA QUÍMICA E INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL", em tempo hábil.

A tese foi defendida nesta data e aprovada pela Comissão Examinadora composta pelos Doutores **Milton Ruiz Alves, Sergei Lerner, Jorge Eduardo Fouto Matias, Antonio Felipe Wouk (Membros)** e **Ana Maria Ramos Moreira (Presidente)**.

E, por ser verdade, firmo a presente.

Curitiba, 25 de julho de 2005

Jorge Eduardo F. Matias

Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

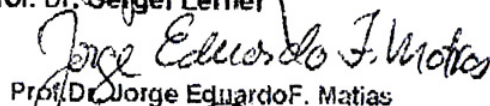
Ata do julgamento da 88ª tese de doutorado 376 do Curso para conclusão do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, referente o aluno **MARCELO LUIZ GEHLEN**, com o título: " **ESTUDO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA CORNEANA AGUDA EM MODELO EXPERIMENTAL APÓS QUEIMADURA QUÍMICA E INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL**", tendo como orientador Prof. Dr. Hamilton Moreira

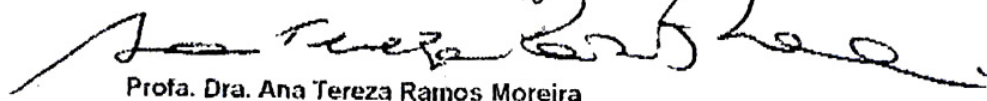
As oito horas do dia vinte e cinco de julho de dois mil e cinco, no Auditório do 7º andar central do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída a Comissão Examinadora pelos Professores Doutores: **Milton Ruiz Alves**, **Sergei Lerner**, **Antonio Felipe Wouk**, **Jorge Eduardo Fouto Matias** e **Ana Tereza Ramos Moreira** sendo este último Presidente da Comissão. Aberta a sessão foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Comissão convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Comissão Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Comissão Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto necessário. Os conceitos e notas atribuídos foram: Prof. Dr. Milton Ruiz Alves: conceito "A" e equivalência "90"; Prof. Dr. Sergei Lerner: conceito "A" e equivalência "90"; Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias: conceito "A" e equivalência "90"; Prof. Dr. Antonio Felipe Wouk: conceito "A" e equivalência "90"; Prof. Dra. Ana Tereza Ramos Moreira: conceito "A" e equivalência "90". Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Comissão leu os conceitos do Parecer Conjunto, dando como final o conceito "A" e equivalência "90", e a recomendação de que a tese com o título já referido, possa ser publicada na forma final nos meios de divulgação científica adequados, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos seguintes componentes da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Milton Ruiz Alves


Prof. Dr. Antonio Felipe Wouk


Prof. Dr. Sergei Lerner


Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias


Prof. Dra. Ana Tereza Ramos Moreira

***'As mulheres que tanto amo nesta vida;
minha esposa Simone e minha filha Luiza.***

*Simone que tanto me inspira, por suas qualidades, não
somente como mãe, mas como pessoa íntegra e leal, que
engrandece todos as nossas ambições e exalta o amor em família.*

*Luiza que tanto me faz sonhar, por suas virtudes, não
somente como filha, mas como pessoa doce e carinhosa, que
fortalece todos os nossos desejos e realiza nossa felicidade no lar...
.E, a Beatriz, que virá nesta atua l gravidez tão desejada, saberá que
reforça ainda mais nossas ambições de vida e visão de mundo.*

*Aos meus pais Valdir e Bernadete,
pela esperança e compreensão,
pela vida e determinação.*

***Aos animais:**
seriam "pobres " os animais, se não fosse por sua
vida e por seu preparo para enfrentar a morte;
seriam " pobres " os seres humanos, se não fosse
pelo reconhecimento científico e sincero agradecimento;
devemos, em pró da ciência, curvar-nos diante do sofrimento
e da subservência destes dignos seres vivos.*

***Ao Superior,**
agradecer a Deus, deve
ter a força da fé, a
esperança no futuro,
a alegria de viver,
a vontade de melhorar e
a intenção de fazer o bem.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho e que me auxiliaram com seus conhecimentos e experiências de vida.

Ao Prof. Dr. HAMILTON MOREIRA, orientador deste trabalho, pelos valiosos e fundamentais conselhos, pela sua sabedoria e compreensão.

Ao Prof. Dr. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade de demonstrar meu estudo.

Ao Prof. Dr. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, exemplo de dedicação, pelas horas difíceis na confecção prática deste trabalho, pela nossa amizade e pelo apoio inestimável ao incentivo científico.

Aos Profs. Drs. CARLOS AUGUSTO MOREIRA, LUCIANE MOREIRA, ANTÔNIO FELIPE P. F. WOUK e THELMA LAROCCA SKARE pelos ensinamentos e auxílio no intercurso desta tese.

Aos Drs. MÁRIO ADOLFO CORRÊA NETO, CARLOS BASTOS, ANA CLAUDIA MARIUSHI, SILVIA REGINA VALGAS e PATRÍCIA STREMMEL pela amizade, espírito científico e companheirismo em toda a elaboração experimental desta tese.

Ao IPEM - Instituto de Pesquisas Médicas do Hospital Universitário Evangélico e ao Hospital Angelina Caron, por ceder as dependências de seus laboratórios para a realização experimental desta pesquisa.

A Universidade Federal do Paraná, por acolher-me como aluno da pós-graduação e oferecer estímulo científico e financeiro para a realização do trabalho.

A Prof.^a FERNANDA ROSA WILLRICH, pelas correções linguísticas desta pesquisa e ao seu esposo, Dr. MACCLEITON GEHLEN, que, além de irmão, é um grande amigo, incentivador e colaborador deste estudo.

Ao Prof. PAULO GUIMARÃES, pelo pronto atendimento e orientações a respeito da avaliação estatística deste trabalho.

Aos meus sogros, AGLAÉ VIOLA AMPUERO e BELISÁRIO AMPUERO VASQUEZ, grandes incentivadores da minha carreira e formação.

SUMARIO

	LISTA DE TABELAS.....	vii
	LISTA DE FIGURAS.....	x
	LISTA DE ABREVIATURAS...	xi
	RESUMO.....	xii
	ABSTRACT.....	xiii
1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	OBJETIVOS.....	7
2	REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1	ANATOMIA DA CÓRNEA HUMANA.....	9
2.2	HISTOLOGIA DA CÓRNEA HUMANA.....	9
2.3	ANATOMIA E FISIOLOGIA DO LIMBO HUMANO.....	11
2.4	ANATOMIA E HISTOLOGIA DA CÓRNEA DO COELHO.....	12
2.5	QUEIMADURAS QUÍMICAS.....	12
2.6	PERMEABILIDADE VASCULAR E INFLAMAÇÃO.....	14
2.7	AZUL DE EVANS.....	16
2.8	MEMBRANA AMNIÓTICA.....	21
2.9	CÉLULAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	24
2.10	CORTICÓIDE (ACETATO DE BETAMETASONA).....	26
2.11	SULFATO DE CONDRÓITINA.....	28
2.12	MEIO DE CONSERVAÇÃO DE CÓRNEA.....	33
3	MATERIAL E MÉTODO.....	35
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.2	AMOSTRA.....	35
3.2.1	Preparo da Amostra.....	35
3.2.1.1	Procedimento Anestésico.....	35
3.2.1.2	Procedimento de queimadura química corneana.....	36
3.2.1.3	Grupo I.....	37
3.2.1.4	Grupo II.....	38

3.2.1.5	Grupo II.....	39
3.2.1.6	Grupo IV.....	40
3.2.1.7	Grupo V.....	42
3.2.1.8	Grupo VI.....	42
3.2.1.9	Grupo VII.....	44
3.3	ORGANIZAÇÃO DO MÉTODO.....	45
3.3.1	Preparo das Soluções e Reagentes.....	45
3.3.1.1	Solução de Azul de Evans.....	45
3.3.1.2	Formamida.....	45
3.3.1.3	Álcali.....	45
3.3.1.4	Extrato de Membrana Amniótica.....	45
3.3.1.5	Corticóide.....	46
3.3.1.6	Sulfato de Condroitina.....	46
3.3.1.7	Meio de Conservação de Córnea.....	46
3.3.2	Inoculação do Azul de Evans.....	47
3.3.3	Injeção de substâncias via subconjuntival.....	47
3.3.4	Eutanásia.....	48
3.3.5	Coleta das Amostras.....	48
3.3.6	Extração do Corante.....	51
3.3.7	Determinação Espectrofotométrica do Azul de Evans na Córnea....	52
3.4	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	52
3.4.1	Análise de Regressão Linear e Correlação.....	52
3.4.2	Análise de Variância.....	53
4	RESULTADOS.....	55
5	DISCUSSÃO.....	62
5.1	GRUPO I.....	62
5.2	GRUPO II.....	64
5.3	GRUPO III.....	67
5.4	GRUPO IV.....	69

5.5	GRUPO V.....	70
5.6	GRUPO VI.....	70
5.7	GRUPO VII.....	72
6	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS, PERÍODO DE COLETA DE AMOSTRAS E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS NO GRUPO I.....	38
TABELA 2	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO II.....	39
TABELA 3	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO III.....	39
TABELA 4	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO IV.....	41
TABELA 5	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO V.....	42
TABELA 6	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO VI.....	43
TABELA 7	DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO VII.....	44
TABELA 8	CURVA PADRÃO DO AZUL DE EVANS.....	52
TABELA 9	VALORES DAS CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE TECIDO CORNEANO (GRUPO I).	55
TABELA 10	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO II.....	56
TABELA 11	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO III.....	57

TABELA	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$	
12	NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO IV.....	57
TABELA	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$	
13	NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO V.....	58
TABELA	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$	
14	NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO VI.....	59
TABELA	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$	
15	NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO VII.....	59
TABELA	CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$	
16	NAS AMOSTRAS CORNEANAS DOS 5 GRUPOS ESTUDADOS.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	QUEIMADURA EM Córnea DIREITA DE COELHO UTILIZANDO PAPEL FILTRO PREVIAMENTE EMBEBIDO EM NaOH.....	36
FIGURA 2	IRRIGAÇÃO COM SORO FISIOLÓGICO A 0,9% APÓS QUEIMADURA COM NaOH NA Córnea DIREITA DE COELHO.....	37
FIGURA 3	Córnea DE COELHO DO GRUPO II APÓS 5 DIAS DE QUEIMADURA POR NaOH.....	38
FIGURA 4	INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL NOS ANIMAIS DO GRUPO III APÓS 12 HORAS DE QUEIMADURA QUÍMICA POR ÁLCALI.....	40
FIGURA 5	INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL NOS ANIMAIS DO GRUPO IV APÓS 6 HORAS DE QUEIMADURA QUÍMICA POR ÁLCALI.....	41
FIGURA 6	INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL NOS ANIMAIS DO GRUPO VI APÓS 12 HORAS DE QUEIMADURA QUÍMICA POR ÁLCALI.....	43
FIGURA 7	DEMONSTRAÇÃO DA INOCULAÇÃO ENDOVENOSA DO AZUL DE EVANS EM VEIA MARGINAL DA ORELHA DIREITA DE COELHO.....	47
FIGURA 8	COLOCAÇÃO DO BLEFAROSTATO ANTES DO INÍCIO DA RETIRADA DA Córnea DE COELHO.....	49
FIGURA 9	RETIRADA DA Córnea DIREITA DE COELHO - 1.....	50
FIGURA 10	RETIRADA DA Córnea DIREITA DE COELHO - 2.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

desvio padrão	DP
graus Celsius	°C
hidróxido de sódio	NaOH
kilograma	kg
limites da variação	L
marca registrada	®
média	M
micrograma	µg
miligrama	mg
milímetro	mm
nanômetro	nm
número	n
olho direito	OD
olho esquerdo	OE
rotações por minuto	rpm

RESUMO

Introdução: Aqueimadura química por álcali na córnea provoca aumento da permeabilidade vascular perilábica e conseqüentemente edema local. Vários estudos demonstram atividade pró-inflamatória das células amnióticas e antiinflamatórias do sulfato de condroitina. **Objetivos:** Os objetivos desta pesquisa são o de estudar a reação inflamatória aguda na córnea de coelhos, após queimadura química, utilizando injeções subconjuntivais de substâncias como: a) Composto de células amnióticas em meio de conservação de córnea (Optisol®); b) Acetato de betametasona; c) Sulfato de condroitina; d) Meio de conservação de córnea (Optisol®). **Material e método:** Utilizou-se 45 coelhos albinos machos, que foram divididos em 7 grupos: Grupo I: composto de 10 animais e que inoculou-se, via endovenosa, 20 mg/Kg de azul de Evans e sacrificou-se os animais 10 horas após inoculação do corante. Extraíu-se o tecido corneano margeado por 1 mm de esclera e quantificou-se o corante através do micrométodo espectrofotométrico. Esta metodologia foi aplicada a todos os grupos. Grupo II: induziu-se queimadura na córnea do olho direito de 10 animais com NaOH a 1 N (metodologia igualmente realizada nos grupos III, IV, V, VI e VII). Cinco dias após o procedimento, os animais foram sacrificados e procedeu-se a extração do azul de Evans, da mesma forma que nos demais grupos. Grupo III: quantificação do corante em 5 coelhos após queimadura e injeção subconjuntival (6, 12 e 24 horas após queimadura) de 0,1 ml do composto de meio de conservação de córnea com células amnióticas. Grupo IV: mensuração do corante em 5 animais depois da injeção subconjuntival (6, 12 e 24 horas após lesão) de 0,1 ml de acetato de betametasona. Grupo V: avaliação quantitativa do corante em 5 coelhos após aplicação subconjuntival de 0,1 ml de soro fisiológico a 0,9%. Grupo VI: mensuração do corante depois da aplicação, via subconjuntival de 0,1 ml de sulfato de condroitina a 3% (6, 12 e 24 horas após queimadura) em 5 animais. Grupo VII: quantificação do azul de Evans após a injeção subconjuntival de 0,1 ml do meio de conservação de córnea Optisol® (6, 12 e 24 horas após injúria química) em 5 coelhos. **Resultados:** As médias das concentrações do azul de Evans nos grupos estudados foram: I: $15,28 \pm 0,09$ µg/mg; II: $23,74 \pm 2,64$ µg/mg; III: $23,69 \pm 2,63$ µg/mg; IV: $15,28 \pm 0,14$ µg/mg; V: $18,21 \pm 2,25$ µg/mg; VI: $13,80 \pm 0,26$ µg/mg; VII: $11,83 \pm 0,58$ µg/mg. **Discussão e Conclusões:** A injeção subconjuntival de acetato de betametasona, de sulfato de condroitina a 3% e do meio de conservação de córnea Optisol® isoladamente, reduziram significativamente ($p < 0,001$) a inflamação corneana após queimadura química. A aplicação de células amnióticas com o meio de conservação de córnea não alterou a quantificação do corante em relação ao grupo que foi realizado somente queimadura sem manipulação ($p > 0,05$). O sulfato de condroitina a 2,5%, existente no meio de conservação de córnea utilizado, provavelmente anulou o efeito pró-inflamatório das células amnióticas.

ABSTRACT

Introduction: Alkali burns in córnea increase perilimbal vascular permeability and cause local edema. Many studies have demonstrated that amnion cells can improve inflammatory process and chondroitin sulphate has antiinflammatory effect. The aims of this study are: a) To study the inflammatory reaction, measured by Evans blue, after alkali burn in cornea and subconjunctival injection of amnion cells in corneal preservation environment; b) To verify the inflammatory process measuring the dye after corneal burn and subconjunctival application of betametasone; c) To observe the inflammation degree after chemical burn and subconjunctival injection of chondroitin sulphate; d) To evaluate the inflammation reaction after alkali burn and subconjunctival application of single corneal preservation environment.

Material and Methods: 45 albino male rabbits were divided into 7 groups: Group I: 10 animals were inoculated with 20 mg/Kg of Evans blue and after 10 hours they were sacrificed. The corneal fragment was extracted with 1 mm of sclera and the concentration of the dye was determined by spectrophotometry. This method was applied in all groups. Group II: ten animals were submitted to chemical burn with 1 N NaOH in right cornea (the same method was used in groups III, IV, V, VI and VII). The rabbits were sacrificed in five days and the dye was extracted, as the same as other groups. Group III: after alkali burn and subconjunctival injections (6, 12 and 24 hours after injury with 0,1 ml of amnion cells in corneal preservation environment), five animals were sacrificed to determine the concentrations of Evans blue dye. Group IV: five animals were used to measure the dye after corneal burn and subconjunctival injections of 0,1 ml of betametasone (6, 12 and 24 hours after injury). Group V: evaluation of concentrations dye in five rabbits after alkali burn and subconjunctival applications of 0,1 ml of fisiologic solution 0,9%. Group VI: Evans blue measured in córnea after chemical burn and subconjunctival injection of 0,1 ml of chondroitin sulphate (6, 12 and 24 hours after injury) in five animals. Group VII: the last group was composed by 5 rabbits that were submitted to alkali burn and subconjunctival injection of 0,1 ml of only corneal preservation environment (6, 12 and 24 hours after injury). **Results:** The Evans blue average concentrations in 7 groups were: I: $15,28 \pm 0,09 \mu\text{g/mg}$; II: $23,74 \pm 2,64 \mu\text{g/mg}$; III: $23,69 \pm 2,63 \mu\text{g/mg}$; IV: $15,28 \pm 0,14 \mu\text{g/mg}$; V: $18,21 \pm 2,25 \mu\text{g/mg}$; VI: $13,80 \pm 0,26 \mu\text{g/mg}$; VII: $11,83 \pm 0,58 \mu\text{g/mg}$. **Discussion and Conclusions:** The subconjunctival injections of betametasone, chondroitin sulphate and corneal survive environment isolately, reduced in significant form ($p < 0,001$) the inflammatory reaction after alkali burn. The application of amnion cells with the corneal preservation environment did not change the Evans blue concentrations compared to another group in which was realized only the chemical burn without manipulations ($p > 0,05$). Chondroitin sulphate, presents in corneal preservation environment, could have annulated the pro-inflammatory effects of amnion cells.

I INTRODUÇÃO

Há vários modelos experimentais de inflamação aguda induzida na córnea. A queimadura química por álcali produz lesão grave ao olho com edema importante, desepitelização e neovascularização (BROWN, 1969; PATTERSON, PFISTER e LEVINSON, 1975; SHAPIRO, FRIEND e THOFT, 1981; GEGGEL, THOFT e FRIEND, 1984; JOHNSON-WINT, 1987; MC CULLEY, 1987; WAGONER, 1997). A inflamação aguda provoca alterações no fluxo sanguíneo, no calibre dos vasos e na permeabilidade vascular. O exsudato desta alteração da permeabilidade vascular contém mais proteínas plasmáticas do que em situação normal (GUYTON, 1976). O azul de Evans se combina à albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada (STEELE e WILHELM, 1966). Autores revelaram que, ao se promover reação inflamatória, o aumento do exsudato plasmático para o tecido lesado eleva as taxas de azul de Evans neste tecido (UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, 1970; BERNAUER, 1980; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988; BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, 1990; OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, 1992; BORDON DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994; GEHLEN, 2001).

Existem técnicas de mensuração da permeabilidade vascular em tecidos como a dosagem de catabólitos do ácido araquidônico (SIMONS, SALMON e MONCADA, 1983; SHARON e STENSON, 1985; VILLASECA, SALAS, GUARNER, RODRIGUEZ e MALAGELADA, 1990), quantificação do conteúdo aquoso, mensuração do escape de albumina marcado com iodo radioativo e marcação vascular com carbono coloidal, sendo que estas técnicas requerem considerável implementação laboratorial (COTRAN, SUTER e MAJNO, 1967; ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 1991). Há outros corantes, além do azul de Evans, que se ligam à albumina, como o azul Celeste de Niágara, o azul Celeste de Pontamina 6BX e o azul de Tripan (STEELE e WILHELM, 1966; UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, 1970; REIS, OKINO, ROCHA e SILVA, 1971; LUNDBERG e SARJA, 1982 e 1983; SARI A,

LUNDBERG, SKOFITSH e LEMBECK, 1983; RINKEMA, BEMIS e FLEISH, 1984; SZABO, BROWN, TRIER e SCHNOOR, 1985; SZABO, PIHAN e TRIER, 1986; ROGERS, BELVISI, AURSUDKIJ, EVANS e BARNÊS, 1988; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988; FINCK, MASHBURN, KOTTKE e ORSZULAK, 1989; LOUIS. JAMIESON, RUSSELL e DOCKRAY, 1989; MCMAHON, LÊWIN, ANAND, GHATEI e BLOOM, 1989; ROGERS, BOSCHETTO e BARNÊS, 1989; BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, 1990; NISHIKAWA, IKEDA, FUKUDA, SUZUKI e OKUBO, 1990; BROKAW e WHITE, 1992; HAAS, NAKANISHI, MACMILLAN, JORDAN e HU, 1992; OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, 1992; BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994). O azul de Evans consiste no corante capaz de ser mensurável através de espectrofotometria (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994 e HAJAR, 1994). Reações inflamatórias induzidas pelo ácido acético a 10% em intestino correlacionam-se com incremento da permeabilidade vascular quantificado pelo azul de Evans. As determinações das concentrações do corante foram realizadas pelo micrométodo espectrofotométrico que requer baixo custo quando comparado a outros modos de quantificação da inflamação aguda (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994 e GEHLEN, 2001). Revisando-se a literatura, encontraram-se relatos de avaliação do fluxo transcapilar evidenciado através do azul de Evans em diversos tecidos, tais como pele, coração e cólon (GREEN, JOHNSON, MARCHESSAUT e GATTO, 1988; BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994). Em 2001, o corante foi estudado no tecido corneano e constatou-se ser um bom método de quantificação de inflamação (GEHLEN, 2001).

A membrana amniótica tem sido usada na oftalmologia desde 1940 em cirurgias de pterígio e em defeitos da conjuntiva (SHIMAZAKI, HAO-YANG e TSUBOTA, 1997). Mais recentemente, o transplante de membrana amniótica está sendo utilizado para facilitar a epitelização corneana, reduzir a inflamação, vascularização e a adesão dos tecidos adjacentes ⁴a córnea. A membrana amniótica é composta de três camadas: um epitélio simples de células cubóides, uma membrana basal espessa e um delgado

estróina avascular (TSENG, 2001). As células amnióticas isoladas, quando estimuladas com citocinas, como a interleucina 1 e fator de necrose tumoral, secretam prostaglandina E2 (BRY e HALLMAN, 1991; KNISS, ZIMMERMAN, FERTEL e IAMS, 1992; SHON, KIM e NAM, 2002; PAVAN, FIORINI, FERRETTI, VESCE e BIONDI, 2003). Estas células também produzem interleucina 6 e fator de necrose tumoral quando em contato com lipopolissacarídeo (SHON, KIM e NAM, 2002). Existe relação estreita entre o início do parto e secreção de prostaglandina E2 pelas células amnióticas aumentando a inflamação. Esta hipótese é reforçada pela ação anti-prostaglandina de alguns antibióticos evitando o parto prematuro, na presença ou não de infecção (PAVAN, FIORINI, FERRETTI, VESCE e BIONDI, 2003).

Os corticosteróides são hormônios utilizados na terapêutica devido ao benefício significativo em grande número de doenças inflamatórias, principalmente pela ação rápida e potente (SKARE, 1999). Nas queimaduras químicas por álcali, o corticóide tópico é utilizado no intuito de diminuir ao máximo a inflamação aguda e preservar a conjuntiva da destruição de células caliciformes (DONSHIK, BERMAN, DOHLMAN, CAGE e ROSE, 1978; BRENT e KARCIOGLU, 1991; CHUNG, KANG e KIM, 1998; DAVIS, ALI, AKLIMANDOS, HUNTER e ALI, 1998; SEKUNDO, AUGUSTIN e STREMPER, 2002). Acredita-se que a injeção subconjuntival de corticóide possa ser de grande benefício nas mãos de oftalmologistas no combate ao processo inflamatório agudo após queimadura química por álcali (PLAIN e HEIN, 1979). O corticóide pode ser utilizado intensivamente durante a primeira semana após injúria química para diminuir o processo inflamatório, porém, logo após, deve ser suspenso devido ao risco de ulceração por inibir a reparação normal do epitélio corneano (DONSHIK, BERMAN, DOHLMAN, CAGE e ROSE, 1978; CHUNG, KANG e KIM, 1998). Os esteróides podem ser efetivos no tratamento do edema corneano por diminuírem a permeabilidade vascular perilímbica e ativarem a função das células endoteliais (FUKUDA, TAKEUCHI e NISHIDA, 2000).

O glicosaminoglicano sulfatado mais comum no corpo humano é o sulfato de condroitina. Esta substância existe no estroma corneano e desempenha papel fundamental na regulação da disposição das fibras colágenas (HASSELL, CINTRON, KUBLIN e NEWSOME, 1983). O sulfato de condroitina possui efeito antiinflamatório e regulatório em condrócitos, sinoviócitos e leucócitos (RONCA, PALMIERI, PANICUCCI e RONCA, 1998). Os glicosaminoglicanos sulfatados atuam como antiinflamatórios inibindo enzimas lisossomiais e proteases, incluindo as beta-glicosaminidases, as beta-glucuronidases, a catepsina e a elastase. Também reduzem o influxo leucocitário, a síntese de prostaglandina E2 e de interleucina 1 e a formação de complementos (PARRY e CRAIG, 1984; RONCA, BURKHARDT e GHOSH, 1987; PIPITONE, 1991; RASHMIR-RAVEN, COYNE, FENWICK, GAUGHAN, ANDREWS e DEBOWES, 1992, MILLER, 1996; PALMIERI, PANICUCCI e RONCA, 1998). O sulfato de condroitina parece indiretamente intervir na migração de células inflamatórias e citocinas do espaço intravascular ao interstício (MACK, PFIRSTINGER, WEBER, NELSON, WEBER, RUPP, MAK, BRUHL e SCHLONDORFF, 2002). Evidências clínicas demonstram eficácia no tratamento de úlceras corneanas persistentes e refratárias em cães, conferindo provável propriedade cicatrizante e antiinflamatória ao sulfato de condroitina (WOUK, MICHELOTTO, TIEPPO, LIMA e KOWAL, 1998).

O meio de conservação de córnea é composto por várias substâncias, entre as mais importantes destacam-se o dextrano, o sulfato de condroitina a 2,5%, vitaminas e precursores de adenosina trifosfato. Há preservação e sobrevivência das células endoteliais por pelo menos 2 semanas quando conservadas a 4 ° C (LINDSTROM, KAUFMAN, SKELNIK, LAING, LASS, MUSC TROUSDALE, REINHART, BURRIS e SUGAR, 1992).

A permeabilidade vascular alterada, evidenciada pelo azul de Evans na córnea, pode abrir possibilidades de pesquisas sobre substâncias que aumentem ou diminuam a inflamação do tecido (GEHLEN, 2001). A literatura consultada não relata trabalhos

científicos averiguando o efeito do sulfato de condroitina e das células amnióticas na queimadura corneana. O corticóide e o meio de conservação de córnea também não foram estudados com esta metodologia.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa são o de estudar a reação inflamatória aguda na córnea de coelhos, após queimadura química, utilizando as injeções subconjuntivais de:

- 1) Suspensão de células amnióticas em meio de conservação de córnea (Optisol®).
- 2) Celestone Soluspan® (Acetato de betametasona).
- 3) Dunason® (Sulfato de condroitina).
- 4) Optisol® (Meio de conservação de córnea).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANATOMIA DA CÓRNEA HUMANA

SPENCER, em 1996, relata que a córnea forma o sexto anterior da circunferência da camada externa do olho. Na sua borda há uma zona transicional conhecida como limbo onde o estroma da córnea une-se à esclera. Seu epitélio encontra progressivamente o epitélio conjuntival e seu endotélio é contínuo com o endotélio trabecular. As lamelas estromais da córnea transparente e da esclera opaca juntam-se posteriormente no estroma médio, formando uma junção difícil de separar, pois está obscurecida pelo tecido episcleral e conjuntiva. Removendo-se os tecidos, a junção é visível como uma zona semi-opaca e azulada. Esta zona é mais larga inferior e superiormente do que nos meridianos horizontais, fato que confere à córnea um aparente aspecto elíptico.

Segundo estudos de YANOFF & FINE em 1996, a córnea de uma pessoa adulta tem um diâmetro médio de 10,5 mm no sentido vertical e 11,5 mm horizontalmente. As superfícies anterior e posterior são paralelas uma à outra nos 4 mm centrais, chamada zona óptica, onde a córnea apresenta uma espessura média de 0,52 mm. Existe um aplanamento da curvatura corneana perifericamente aumentando a espessura do tecido para uma média de 0,65 mm.

2.2 HISTOLOGIA DA CÓRNEA HUMANA

Em seus estudos anátomo-histológicos, MCLEAN, BURNIER, ZIMMERMAN e JAKOBIEC, no ano de 1994, descreveram que o epitélio é composto de cinco a seis camadas de células (epitélio escamoso estratificado). Na periferia, o número de camadas pode aumentar para oito a dez. A junção entre as células epiteliais e sua membrana basal, assim como a adesão desta à camada de Bowman dependem de

interações bioquímicas e estruturais. A membrana basal é composta de colágeno tipo IV, proteoglicanos (heparan sulfato), fibronectina, fibrinogênio, laminina (glicoproteína que liga a membrana basal às células epiteliais) e superfícies celulares. A camada estromal da córnea (substância própria) é formada por fibrilas colágenas tipo I e II, queratócitos e fibras nervosas amielínicas. A substância fundamental contém sulfato de condroitina / dermatana, queratossulfato e ácido hialurônico que são essenciais para a manutenção da adequada hidratação da córnea.

Hemidesmossomos e filamentos finos podem ser observados na união da membrana basal às células basais. Segundo SPENCER em 1996, estas células tem o maior poder mitótico entre todas as camadas da córnea. Acima da camada basal existe aproximadamente três camadas de células poliédricas que estão firmemente aderidas entre si. A camada mais externa é composta de células largas e achatadas que possuem microvilosidades e microplicas.

MCLEAN, BURNIER, ZIMMERMAN e JACOBIEC, em 1994, também estudaram a camada de Bowman que consiste em uma estrutura de aproximadamente 10 nm, avascular, situada abaixo da membrana basal do epitélio. Ela representa a modificação do estroma anterior e compõe-se de fibras colágenas e substância mucoproteica. Há poros nesta camada que dão passagem a ramos terminais da inervação corneana.

Formado por fibras colágenas e células (ceratócitos), o estroma representa 90% da espessura da córnea. As lamelas das fibras colágenas dispõem-se paralelamente entre si e são entremeadas pelos ceratócitos. Também encontram-se fibroblastos entre o colágeno conforme escrevem YANOFF & FINE, em 1996. O mesmo autor descreveu a membrana de Descemet como sendo composta de filamentos semelhantes ao colágeno entremeados com substância básica interfilar. A membrana de Descemet consiste na membrana basal secretada pelas células endoteliais.

Originário da crista neural, o endotélio é composto de uma única camada de células situadas internamente à membrana de Descemet. Raramente as células sofrem mitose, conforme relatado por SPENCER, em 1996.

2.3 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO LIMBO HUMANO

A região de transição entre córnea e esclera chama-se limbo. Apresenta algumas características próprias como a ausência de células caliciformes e as elevações fibrovasculares radiais (paliçadas de Vogt). O epitélio contém 10 a 12 camadas de células além de melanócitos e células de Langerhans. Vasos sanguíneos são observados nesta região e nas paliçadas de Vogt há uma densidade elevada de células basais precursoras de epitélio corneano segundo DUA, GOMES e SINGH, em 1994.

As células epiteliais corneanas renovam-se rápida e continuamente para manter a estrutura estratificada do epitélio. THOFT & FRIEND (1983) propuseram a teoria XYZ, que seria um equilíbrio entre o movimento centrípeto das células epiteliais, o movimento das células basais em direção às células superficiais e a taxa de descamação da superfície corneana.

ZIESKE, no ano de 1994, descreve haver considerável diferença entre o limbo e a área central. A mais importante delas é a presença de vasos sanguíneos no limbo. Esses vasos ajudam a formar a paliçada de Vogt, permitindo estreita aproximação dos vasos ao epitélio limbar. Os numerosos canais arteriais do limbo são provenientes dos vasos conjuntivais e das artérias ciliares anteriores. A função principal é nutrir a conjuntiva, episclera e a esclera na região do canal de Schlemm. Estes vasos, conforme descrito por YANOFF & FINE, em 1996, também nutrem o estroma corneano periférico. Em estados patológicos, servem como fonte de neovascularização subepitelial e estromal.

2.4 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA CÓRNEA DO COELHO

PRINCE, DIESEN, EGLITIS, et ai. (1960) e YANOFF & FINE (1996) descrevem que o olho do coelho tem 16 a 19 mm de comprimento e que a córnea e a esclera têm praticamente a mesma curvatura, o que faz com que o sulco córneo-escleral seja pouco marcante. O epitélio apresenta uma camada de células basais e três a cinco camadas de células poliédricas e escamosas superficiais. Segundo HIRST, KENYON, FOGLE et al. (1981) não há camada de Bowman compacta na córnea do coelho.

CINTRON e COVINGTON, em 1990, demonstraram que a córnea é composta de proteoglicanos e que estes estão distribuídos de maneira desigual no tecido. O sulfato de condroitina é predominante no estroma posterior. Há evidências citoquímicas de que o sulfato de condroitina seja o único encontrado na fase embriológica de formação corneana.

2.5 QUEIMADURAS QUÍMICAS

BROWN, em 1969, demonstrou que há inflamação e vascularização (com emergência de novos vasos) na córnea após queimadura por álcali.

PATERSON, PFISTER e LEVINSON (1975) revelam haver sinais de penetração na câmara anterior após o acidente com hidróxido de sódio e que estes podem ser percebidos 3 a 5 minutos depois da queimadura.

A queimadura da córnea implica em graves complicações como defeitos epiteliais persistentes, úlceras tróficas, neovascularização, necrose corneana ou até perfurações oculares conforme descreveu THOFT, em 1977.

SHAPIRO, FRIEND e THOFT, em 1981, e GEGGEE, THOFT e FRIEND, em 1984 e 1989, afirmaram que, em queimaduras extensas, o epitélio conjuntival representa a única fonte de regeneração epitelial, causando processo de "conjuntivalização" da superfície corneana.

JOHNSON-WINT (1987) revelou que o epitélio em regeneração pode estimular a atividade de collagenases. Após a reepitelização, o epitélio recupera sua função inibitória comum.

WAGONER (1997) relata que as queimaduras químicas podem produzir grave dano ao olho e conseqüentemente à visão. Pode ocorrer lesão da superfície epitelial corneana, do estroma, do endotélio da córnea e do próprio segmento anterior como íris, cristalino e corpo ciliar. Os agentes químicos que mais causam queimadura ocular são: amônia, cal, soda cáustica e hidróxido de potássio. Todos estes álcalis penetram imediatamente no olho, promovendo injúrias às estruturas oculares.

Segundo MCCULEEY, em 1987, a gravidade da lesão depende da superfície da área afetada e do grau de penetração no globo ocular. O ânion hidróxido (OH) saponifica os ácidos gordurosos das membranas celulares, com resultante rotura e morte celular e o cátion é responsável pela penetração do álcali específico. Cátions reagem com os grupos carboxílicos (COOH) do colágeno estromal e dos glicosaminoglicanos e a hidratação destes resulta em perda da transparência do estroma. WAGONER (1997) ainda relata que a hidratação das fibrilas colágenas provoca espessamento e encurtamento destas, o que distorce o trabeculado escleral, predispondo à liberação de prostaglandinas que acabam por aumentar a pressão intra-ocular imediatamente após a queimadura química.

Clinicamente está bem estabelecido que, após uma queimadura química, o crescimento de epitélio conjuntival na superfície corneana está associado com retardo de epitelização, neovascularização superficial e profunda, persistência de células

caliciformes e erosões epiteliais recorrentes devido à adesão epitelial anormal da membrana basal, conforme WAGONER estudou em 1997.

2.6 PERMEABILIDADE VASCULAR E INFLAMAÇÃO

ROBBINS, CONTRAN e KUMAR, em 1991, descrevem que a inflamação foi considerada como doença até 1794, quando se estudou que as alterações teciduais eram uma resposta inespecífica, causada por todas as formas de lesão, sendo tanto proposital, como benéfica por natureza.

São quatro os sinais de inflamação descritos por Cornelius Celsus: o calor, o rubor, o tumor e a dor. Virchow acrescentou um quinto sinal, a perda de função, conforme citado por WILHELM (1982). O calor local e o rubor resultam do aumento da microcirculação em torno da área lesada. O tumor é caracterizado pelo edema produzido pelo escape de líquido, proteínas e células do plasma, dos vasos sanguíneos para os tecidos perivasculares. VANE (1976) estudou que a dor pode ser induzida por prostaglandinas quando há liberação simultânea de bradicinina ou serotonina, ou quando há aumento da tensão tissular devido ao edema.

As manifestações locais da inflamação aguda mostram três componentes da resposta inflamatória: alterações no fluxo vascular e no calibre dos vasos, alterações da permeabilidade vascular e exsudação leucocitária, conforme citado por GUYTON (1976).

O endotélio dos capilares e a porção proximal das vênulas formam uma membrana semipermeável que permite a livre passagem de pequenas moléculas e água, mas que não permite normalmente a passagem de proteínas plasmáticas. De acordo com a teoria de STARLING, citado por GUYTON em 1976, o equilíbrio dos fluídos através de uma barreira endotelial é mantido pela pressão oncótica das proteínas plasmáticas. Ocorre na inflamação, nítido movimento dos fluídos para dentro

dos tecidos, que tem sido estimado como sendo cinco a sete vezes maior do que num vaso normal. O exsudato fluído de inflamação contém caracteristicamente 1 a 6 g de proteínas plasmáticas por 100 ml.

Os fatores que podem estar envolvidos na formação do exsudato são: aumento na pressão hidrostática, aumento do fluxo sanguíneo através da rede local e alterações na permeabilidade da parede vascular. Este último fator parece ser resultante de uma mediação bioquímica, conforme citado por GUYTON em HAJAR (1994).

SKARE, em 1999, descreve os mediadores do processo inflamatório que influenciam na injúria tissular. Estes compostos agem sobre o músculo liso, na parede do vaso sanguíneo, e alguns deles têm função de quimiotaxia. Os fosfolipídeos, presentes na membrana plasmática celular, possuem ácido araquidônico, que é liberado por ação enzimática da fosfolipase. O ácido araquidônico pode ser transformado em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano por intervenção da enzima ciclooxigenase ou em leucotrienos e lipoxinas devido ⁴a enzima lipoxigenase. As prostaglandinas fazem parte da família de compostos formados por 20 carbonos, cinco dos quais formam uma unidade ciclopentano, sendo que o restante está arranjado em cadeias alifáticas. São indicadas pelo símbolo PG seguido de uma letra (que indica onde está a unidade ciclopentano) e um número (que diz quantas pontes duplas há nas cadeias alifáticas). Além disso, em alguns casos, pode existir uma letra grega a qual indica se um grupo OH do carbono C9 está ou não do mesmo lado que o grupo OH da cadeia lateral. Existem duas ciclooxigenases (COX) com funções diferentes: a COX 1 fabrica prostaglandinas para funções necessárias e fisiológicas como secreção de muco no estômago e manutenção do fluxo sanguíneo renal; a COX 2 estimula prostaglandinas pró-inflamatórias e agem somente em situações de exceção. As citocinas são substâncias que servem como mensageiros intercelulares para desenvolvimento de determinada ação. As principais citocinas pró-inflamatórias são a interleucina 1, o fator de necrose tumoral, a interleucina 6 e a interleucina 8.

KLEIN, em 1991, refere que a PGE2 é uma das principais prostaglandinas de interesse clínico-fisiológico e importante fator pró-inflamatório.

As prostaglandinas têm sido implicadas no aumento da permeabilidade vascular endotelial, principalmente durante o processo de inflamação. Muitas citocinas, como fator de necrose tumoral, podem estimular a secreção de prostaglandinas por células endoteliais, conforme citaram CHEN, YANG, HILSENATH, LÊ SP e HARPER, em 1995.

MEIJER, TAK, VAN HAERINGEN e KIJLSTRA estudaram, em 1996, a relação entre prostaglandinas e óxido nítrico na reação alérgica conjuntival. Os autores constataram que as duas substâncias causaram e perpetuaram a vasodilatação conjuntival e induziram ao extravazamento de albumina levando ao edema local.

2.7 AZUL DE EVANS

RAWSON, em 1943; LEVEEN e FISHMAN, em 1947 e FREEDMAN e JOHNSON, em 1969, estudaram o corante azul de Evans. O corante, conhecido também como T-1824, consiste em um sal orgânico, diazo-tetrassódico, com peso molecular de 960,8. É inócuo, tem alta afinidade pela albumina plasmática, não é radioativo e possui alta solubilidade em água.

Desde os estudos de RAWSON em 1943 que a combinação corante-albumina foi demonstrada. O T-1824 combina-se à albumina quando presente em baixa concentração. Quando há saturação, o autor evidenciou que o corante também ligava-se às globulinas.

Inicialmente, o azul de Evans, após inoculação endovenosa, distribui-se de forma correspondente ao volume plasmático. O declínio nas primeiras horas é o resultado da difusão para os tecidos através do fluxo transcapilar, conforme citado por

NOBLE, GREGERSEN, PORTER e BUCKMAN, em 1946 e GREEN, JOHNSON, MARCHESSAUT e GATTO. em 1988.

LEVEEN e FISHMAN, em 1947, realizaram um estudo das taxas de desaparecimento do corante na circulação em humanos, durante o período de 24 horas. Os resultados revelaram que a média de saída do corante da circulação era de 46%. Os autores demonstraram que a quantidade do corante em que a albumina se liga varia com o pH numa reação reversível. Nas condições de estudo com pH de 2,5, a quantidade de moléculas de corante por molécula de albumina era de 70:1. Em outra fase do experimento, demonstrou-se uma solução contendo albumina e corante na proporção de 7:29. Passando-se por uma resina que aceita somente íons livres, foi removido 50% do corante, concluindo-se que ocorreu dissociação do complexo albumina-corante e transferência deste para a resina. Esta seria a explicação do aparecimento do corante nos tecidos e secreções, além de explicar o mecanismo de desaparecimento do corante da circulação sem estar acompanhado da albumina.

O azul de Evans forma um complexo estável com as proteínas plasmáticas. Quando é injetado na circulação sanguínea em baixas concentrações, combina-se preferencialmente à albumina. Quando a concentração se eleva e a albumina plasmática é saturada, o corante passa também a ligar-se às globulinas plasmáticas, selecionando primeiramente as alfa globulinas. Após injetados 20 mg do azul de Evans intravenosamente em ratos de 200g, não são encontradas quantidades mensuráveis do corante livre no sangue circulante, como constatarem SELLERS, GRIGGS, MARMORSTON e GOODMAN, em 1954. O seu deslocamento da circulação é influenciado pela quantidade que as proteínas tissulares são capazes de fixar.

CASTER, SIMON e ARMSTRONG, em 1955, determinaram o volume plasmático nos tecidos de ratos albinos. Este volume dependia da quantificação simultânea do azul de Evans em plasma e tecidos aos 5 minutos de inoculação endovenosa do corante. Elaboraram-se curvas de tempo-concentração do corante para

diversos tecidos, observando que existiam diferenças entre as curvas. A interpretação da forma da curva plasmática, que seria a soma de todos os eventos em cada tecido, pode ser separada em três fases: uma fase de rápido desaparecimento necessário para a distribuição de todo o corante no sistema vascular, com aproximadamente 11 ml de plasma; outra fase de mistura, necessária para a distribuição do corante no leito capilar tecidual e por último a fase de transferência do corante que continua por várias horas e até dias, que diferem em ritmo para os diferentes tecidos. Após injeção endovenosa de 20 mg de azul de Evans, em 24 horas, 16% pode ser encontrado no plasma, 30% na pele, 13% no músculo, 12% no fígado e 9% nos ossos. Pouca quantidade foi encontrada nas fezes e nada se achou na urina.

CLAUSEN E LIFSON, em 1956, propuseram a determinação do azul de Evans no sangue e nos tecidos. Homogeneizaram o tecido em solução concentrada de ureia, desligaram o corante da albumina, precipitaram parcialmente com acetona e depois completamente com adição de reagentes Somogy. O método foi utilizado para seguir a direção do corante após a injeção intravenosa de 12,5 mg de azul de Evans em ratos. Após 40 horas desta administração, observaram que 90% do corante injetado deixou a circulação, mas somente 15% não foi recuperado do organismo. 67% do corante poderia ser recuperado do organismo depois de 140 horas do estudo. Os autores concluíram que o método servia para quantificar o azul de Evans nos tecidos.

UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, em 1970, quantificaram o aumento da permeabilidade capilar em coelhos, ratos e cobaias albinas que receberam azul de Evans por via intravenosa. Induziram-se várias lesões inflamatórias na pele. Os fragmentos do tecido lesado foram removidos, cortados e colocados em formamida. A quantidade do corante extravasado aos tecidos foi extraído com formamida e calculado quantitativamente por colorimetria. O trabalho constatou que as lesões inflamatórias têm sua permeabilidade vascular aumentada, evidenciada pelo azul de Evans.

BERNAUER (1980) avaliou fatores que incrementam os níveis de acúmulo do complexo corante-albumina nos tecidos. Mediadores químicos da inflamação e injúrias com lesão vascular direta são exemplos que aumentam o fluxo transcapilar. Portanto, a avaliação desses fenômenos torna-se útil para análise dos intercâmbios transcapilares em circunstâncias de permeabilidade microvascular alterada. A quantidade de albumina que flui normalmente para os tecidos não é significativa, mas o extravasamento é importante em vigência do aumento da permeabilidade capilar.

Em 1982, LUNDBERG e SARIA estudaram o envolvimento dos neurônios sensoriais vagais no controle da permeabilidade vascular da mucosa da traquéia de ratos. 20 mg/kg de azul de Evans foram injetados endovenosamente 5 minutos antes do estímulo vagal. Após injeção, o animal era irrigado com solução fisiológica e então sacrificado. Retirava-se 1 centímetro de segmento da traquéia, pesava-se e colocava-se em formamida. O azul de Evans extraído com a formamida era lido espectrofotometricamente. Animais controle foram estudados com igual metodologia, porém sem receber estímulo vagal. Nos animais estimulados, o conteúdo do corante era maior indicando um aumento da permeabilidade vascular. A estimulação elétrica do nervo vago alterou a cor da traquéia de branco para azul intenso. Em 1983, os mesmos autores estudaram o efeito da fumaça do cigarro, irritação mecânica, irritação química e o estímulo vagal sobre a mucosa da traquéia e brônquios de ratos Sprague-Dawley, concluindo que esses estímulos induziram edema subepitelial indicado pelo extravasamento do azul de Evans.

WOODS, SMITH e GRAHAM, em 1988, estudaram o aumento da mensuração do azul de Evans como indicador de lesão aguda da mucosa gástrica produzida pela aspirina. Os níveis de azul de Evans no conteúdo gástrico e no plasma foram medidos espectrofotometricamente. Os autores concluíram que a exsudação do azul de Evans no conteúdo gástrico ofereceria índice precoce qualitativo e possivelmente quantitativo da injúria da mucosa gástrica.

GREEN, JOHNSON, MARCHESSAULT e GAITO, em 1988, estudaram, em cobaias normais e cobaias submetidas a doses sistêmicas de histamina e endotoxina, a permeabilidade microvascular e a distribuição histológica do azul de Evans. O corante foi injetado por via endovenosa e as amostras foram coletadas em diferentes períodos de tempo. Os animais submetidos a ação da histamina e endotoxina receberam a administração destas substâncias 1 hora antes da inoculação do azul de Evans. O corante foi extraído dos tecidos e o extrato lido espectrofotometricamente. Foi demonstrado que o declínio das concentrações plasmáticas era o resultado da acumulação do corante nos compartimentos teciduais. Observaram maior declínio depois da utilização da endotoxina e histamina, devido ao incremento da permeabilidade vascular provocado por estas substâncias.

Em 1990, BACCARO, MARIANO e MALUCELLI realizaram experimentos em ratos Wistar produzindo lesões com nistatina e BCG. Utilizaram plasma não ativado e inibiram os fenômenos com antiinflamatório não esteróide. As alterações na permeabilidade vascular foram mensuradas pelos níveis de azul de Evans teciduais.

O extravasamento microvascular é uma característica primária da inflamação induzida com antígenos que levam à exsudação plasmática nas vias aéreas. OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, em 1992, destacaram a ação dos leucotrienos no estreitamento brônquico e nos vasos endoteliais. Quando inibiram os leucotrienos, houve diminuição do extravasamento proteico produzido pela ação agressora do antígeno sobre os vasos. A concentração do azul de Evans aumentou quando havia lesão vascular no tecido pulmonar estudado.

BORDÓN DE CORVALÁN, em 1994, padronizou um micrométodo espectrofotométrico para quantificar o azul de Evans em micrograma por miligrama de tecido. A autora evidenciou o fluxo transcapilar do corante ao tecido colônico de ratos Wistar.

Em HAJAR (1994) foi citado que na avaliação da permeabilidade vascular dos tecidos, podem ser utilizadas algumas técnicas como: quantificação do conteúdo aquoso, mensuração do escape de albumina marcada com iodo radioativo, marcação vascular com carbono coloidal (ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 1991; COTRAN, SUTER e MAJNO, 1967) e avaliação do extravasamento de corantes injetados por via endovenosa, como o azul de Evans (T-1824), azul Celeste de Pontamina 6BX e azul de Tripán (STEELE e WILHELM, 1966; UKADA, TAKEUCHI e MOVAT, 1970; REIS, OKINO, ROCHA e SILVA, 1971; UNDBERG e SÁRIA, 1982 e 1983; SÁRIA, LUNDBERG, SKOFITSH e LEMBECK, 1983; RINKEMA, BEMIS e FLEISH, 1984; SZABO, BROWN, TRIER e SCHNOOR, 1985; SZABO, PIHAN e TRIER, 1986; ROGERS, BELVISI, AURSUDKIJ, EVANS e BARNÊS, 1988; WOODS, SMITH e GRAHAM, 1988; FINCK, MASHBURN, OTTKE e ORSZULAK, 1989; LOUIS, JAMIESON, RUSSELL e DOCKRAY, 1989; MCMAHON, LEWIN, ANAND, GHATEI e BLOOM, 1989; ROGERS, BOSCHETTO e BARNES, 1989; BACCARO, MARIANO e MALUCELLI, 1990; NISHIKAWA, IKEDA, FUKUDA, SUZUKI e OKUBO, 1990; BROKAW e WHITE, 1992; HAAS, NAKANISHI, MACMILLAN, JORDAN e HU, 1992; OBATA, KOBAYASHI, OKADA, NAKAGAWA, TERAWAKI e AISHITA, 1992; BORDÓN DE CORVALÁN, 1994). O autor utilizou o azul de Evans para avaliar a permeabilidade vascular em ratos Wistar que foram submetidos à colite induzida por ácido acético a 10%.

GEHLEN, em 2001, demonstrou, pela primeira vez, o azul de Evans em córnea de coelhos. O autor confirmou que, após 10 horas de inoculação endovenosa, há maior quantidade do corante em córneas normais destes animais e que a distribuição do azul de Evans ocorre de forma centrípeta. Também foi constatado que a queimadura por álcali aumentou os níveis do corante na córnea, confirmando que a utilização do azul de Evans serve como método de quantificação de reação inflamatória.

2.8 MEMBRANA AMNIOTICA

Em 1910, DAVIS sugeriu o uso da membrana amniótica para uso como substituto da pele. Este tecido, originário da placenta, tornou-se importante devido 'a sua propriedade de diminuir a ocorrência da adesão e úlceras, além de promover epitelização e possuir atividade antimicrobiana (AKLE, ADINOLFI, WELSH, LEIBOWITZ e MCCOLL, 1981).

DE ROTH, em 1940, utilizou na oftalmologia um fragmento de membrana amniótica fresca 'a qual recobriu o tecido conjuntival com relativo sucesso.

SORSBY e SYMONS, em 1946, reportaram o sucesso do uso da membrana amniótica após queimadura química ocular.

AKLE, ADINOLFI, WELSH, LEIBOWITZ e MCCOLL, em 1981, demonstraram particularidades da membrana amniótica. As células da membrana expressam HLA incompleto do tipo A, B e C, fato que corrobora para a não observação de rejeição de transplante. A membrana amniótica consiste numa camada única de células cubóides com membrana basal espessa e estroma avascular, levemente aderida ao córion. Estas células do âmnio têm potencial para se transformar em células de outros tecidos.

TSENG , em 1989, relatou os efeitos clínicos da utilização da membrana amniótica: facilitação da epitelização, manutenção do fenótipo epitelial normal e redução da inflamação, ulceração, vascularização e aderência dos tecidos. Os autores citaram como principais indicações do uso da membrana: ceratites de diversas origens, defeitos epiteliais corneanos persistentes e doenças conjuntivais severas como síndrome de Stevens-Johnson e penfigóide. Cirurgias de pterígio e glaucoma podem ser beneficiadas com o uso da membrana.

Segundo TSENG, PRABHASAWAT, BARTON, GRAY e MELLER, em 1998, quando há queimadura com destruição extensa da superfície ocular, há

necessidade de transplante de membrana amniótica adicionado de enxerto de células do limbo.

O transplante de células de limbo, cultivado em membrana amniótica como substrato, possui efeito antiinflamatório e antiangiogênico como relataram TSAI, LI e CHEK em 2000.

PRABHASAWAT, KOSRIRUKVONGS, BOORANAPONG e VAJARADUL, em 2001, confirmaram que o transplante de membrana amniótica pode resolver alguns danos *a superfície ocular como desepitelização, inflamação e cicatrização.

Discordando de que a membrana amniótica serve apenas como substrato para reconstrução da superfície ocular, SOLOMON, ROSENBLATT, MONROY, PFLUGFELDER e TSENG, em 2001, revelaram a importância do estroma na regulação da interleucina 1 alfa e beta. Os autores confirmaram o efeito antiinflamatório do estroma da membrana amniótica.

O transplante de membrana consiste no método seguro e efetivo do restabelecimento da superfície ocular com deficiência de células limbares, conforme citou ANDERSON, ELLIES, PIRES e TSENG em 2001.

A membrana amniótica é composta de um epitélio simples com membrana basal espessa associado a delgado estroma avascular. Em 2001, TSENG demonstrou ser a membrana um excelente substrato para proliferação de células epiteliais da conjuntiva in vivo. A supressão de fatores de crescimento e de células inflamatórias contribuem para a redução da vascularização e inflamação local. A promoção de diferenciação das células mãe em células do tecido conjuntival faz com que a membrana amniótica contribua para a epitelização e manutenção do fenótipo ocular normal.

Além de possuir propriedades antiinflamatórias, MURAINÉ, DESCARGUES, FRANCK, VILLEROY, TOUBEAU, MENGUY, MARTINS e BRASSEUR constataram, em 2001, o efeito anti-apoptótico do âmnio para prevenir perda de células totipotentes do limbo. Também confirmaram atividade antibacteriana, facilitação da migração de células epiteliais e aumento da diferenciação celular.

Em 2003, ZHOU, CHEN e FENG concluíram que a membrana amniótica pode acelerar a apoptose de polimorfonucleares reduzindo a inflamação.

O transplante de membrana amniótica realizado na fase aguda da inflamação, causada por queimadura química, previne a formação de úlceras, perfuração e neovascularização corneana, conforme citaram ZHOU, CHEN, LI U, HUANG e CHEN, em 2004.

2.9 CÉLULAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA

As células amnióticas, mantidas em cultura, secretam prostaglandina E2. Na presença de inibidor de prostaglandina sintetase, a produção da substância cessou. Estas células constituem excelente modo de investigação na produção de prostaglandinas, como descreveram CASEY, MACDONALD e MITCHELL em 1984.

As células do âmnio são epitelióides, com citoplasma repleto de microtúbulos e filamentos. Algumas projeções citoplasmáticas fazem conexão entre as células amnióticas. Elas possuem muitos ribossomos livres, mitocôndrias tubulares, lisossomas e retículo plasmático rugoso com microfilamentos de 6 a 10 nm. O núcleo é pleomórfico e os nucléolos são comuns e evidentes, conforme citaram os autores MEEK e DA VIS em 1986.

Em 1991, BRY e HALLMAN estudaram a interação entre fatores inflamatórios e a produção de prostaglandina E2 pelas células amnióticas. In vitro, os autores constataram que fatores estimuladores de granulócitos, interleucinas 1 alfa e beta e fator de necrose tumoral alfa e beta aumentaram a produção de prostaglandina E2 pelas células amnióticas. Associados, estes elementos inflamatórios incrementavam a produção. Propõe-se que os fatores estimuladores de colônia de granulócitos atuando com interleucinas e fatores de necrose tumoral aumentem a síntese de prostaglandina E2 durante o curso da inflamação.

Evidências implicam as citocinas e fatores de crescimento como responsáveis pelo início do parto na mulher. Células amnióticas foram utilizadas para determinar se citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a produção de prostaglandina E2. KNISS, ZIMMERMAN, FERTEL e IAMS, em 1992, confirmaram que citocinas (interleucina 1 beta, fator de necrose tumoral alfa e fator estimulador de colônia de granulócitos) incrementaram a produção de prostaglandina E2 produzidas pelas células do âmnio, mesmo em baixas concentrações. Concluiu-se que as citocinas modulam a função das células amnióticas e amplificam o processo inflamatório.

As células do âmnio produzem citocinas e prostaglandinas em resposta a sinais endócrinos e parácrinos no curso da gravidez. Recentemente, em 2003, PAVAN, FIORINI, FERRETTI, VESCE e BIONDI, descreveram que as células amnióticas são capazes de produzir lecitina, que pode regular outros elementos, como glicocorticóides e fator de crescimento epitelial. O início do parto representa a secreção de prostaglandinas pelas células do âmnio, existindo analogia entre a inflamação e atividade do miométrio no parto. A similaridade entre parto e resposta inflamatória é reforçada pela ação anti-prostaglandina de alguns antibióticos, utilizados para evitar o parto prematuro. O mecanismo pelo qual algumas substâncias excitam as células do âmnio para produzirem prostaglandinas ainda não está bem elucidado.

Em 2003, SHON, KIM e NAM estudaram o estímulo do lipopolissacarídeo, da interleucina 6 e do fator de necrose tumoral alfa na produção de prostaglandina E2 pelas células do âmnio. Neste estudo, os autores utilizaram o extrato de Astragali para inibir a produção de prostaglandina E2 e interleucina 6 secretadas pelas células amnióticas. Também constataram a ineficiência do Astragali sobre o fator de necrose tumoral alfa. Verificou-se que as células amnióticas, quando estimuladas por lipopolissacarídeo, produzem interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, além das prostaglandinas.

2.10 CORTICÓIDE (ACETATO DE BETAMETASONA)

Em 1976, FAUCI, DALE e BALLOW estudaram os efeitos clínicos e o mecanismo de ação dos glicocorticóides. Os autores demonstraram que a betametasona possui alta potência, efeito rápido e ação longa no ser humano. Constatou-se também, que o efeito antiinflamatório da droga deve-se principalmente 'a alteração no trânsito leucocitário, mais até do que a ação na função da própria célula.

DONSHIK, BERMAN, DOHLMAN, CAGE e ROSE, no ano de 1978, estudaram os efeitos do corticóide no processo inflamatório gerado após trauma químico com álcali na córnea e conjuntiva. O uso do anti inflamatório na primeira semana produz muitos benefícios 'a superfície ocular, porém, depois de 7 dias, a substância causa inibição do processo de cicatrização, aumentando as chances de ulceração corneana.

Existem várias vias de inoculação ocular do corticóide. A via tópica, através da administração de colírios, é comumente mais utilizada. A via subconjuntival pode gerar grande benefício quando bem indicada devido 'a sua maior penetração e maior atividade antiinflamatória que a via tópica, conforme descrevem PLAIN e HEIN, em 1979.

As células caliciformes são afetadas na queimadura química por álcali. A aplicação de corticóide, na fase aguda da injúria e do processo inflamatório, protege o dano maior 'as células caliciformes que a própria inflamação pode gerar. No ano de 1991, BRENT e KARCIOGLU sugerem o uso de corticóide tópico para suprimir a perda de células caliciformes após queimadura química.

Em 1998, CHUNG, KANG e KIM estudaram o defeito epitelial contínuo no uso crônico do corticóide tópico. Constataram que o medicamento somente deve ser utilizado na fase aguda do processo inflamatório após queimadura ocular.

SKARE, em 1999, relatou as principais ações do corticosteróide no corpo humano. A presença da atividade do glicocorticóide está na dependência do radical hidroxila (OH) no carbono 11. Corticóide sem este radical devem sofrer hidroxilação no fígado para se tornar ativo. Portanto, no olho, deve ser instilado ou inoculado a medicação na sua forma ativa. Nas células, o corticóide ativa o AMP cíclico, o qual modularia a síntese de proteínas. Também interage com o DNA celular alterando a transcrição do RNA mensageiro específico. Este RNA comanda a síntese de novas proteínas chamadas lipocortinas, como a lipomodulina, capaz de inibir a fosfolipase, enzima precursora do ácido araquidônico, o qual é necessário para a produção das prostaglandinas e leucotrienos. Os corticosteróides ligam-se 'a receptores celulares, que possuem densidades diferentes em subpopulações de linfócitos, explicando por que os linfócitos T são mais sensíveis aos linfócitos B no uso terapêutico do hormônio. Os esteróides têm o seu principal efeito antiinflamatório ao inibirem os neutrófilos de se marginalizarem e aderirem 'a parede dos vasos sanguíneos. Estas alterações no trânsito leucocitário são associadas 'a vasoconstrição provocada pelo hormônio, diminuindo portanto o aporte de proteínas ao tecido injuriado e reduzindo o edema. Os glicocorticóides são potentes inibidores da síntese de vários moduladores do processo inflamatório. Agem sobre prostaglandinas, leucotrienos, moléculas de adesão e citocinas. A transcrição do fator de necrose tumoral alfa, das interleucinas de 1 a 8 (menos a interleucina 7) e do gama interferon são inibidas pelo corticóide. No

processo inflamatório agudo, uma das principais ações do esteróide é minimizar a permeabilidade vascular.

No ano de 2000, FUKUDA, TAKEUCHI e NISHIDA constataram que a cortisona pode afetar a função das células endoteliais aliando-se ao seu efeito anti inflamatório. O uso local do hormônio torna-se efetivo no tratamento do edema corneano devido 'a redução da permeabilidade vascular.

SEKUNDO, AUGUSTIN e STREMPER, em 2002, estudaram o tratamento com corticóide após queimadura química em olhos de ratos e constataram efeito anti inflamatório significativo. Havia diminuição do número de células inflamatórias no grupo que utilizou terapia com o esteróide.

2.11 SULFATO DE CONDROITINA

Em 1982, HARRISON, SOLL, SHAYEGAN e CLINCH demonstraram que o sulfato de condroitina reduz a interação eletrostática entre o endotélio e a lente intra-ocular demonstrando efeito protetor quando inoculado na câmara anterior do olho durante a realização de facectomia. Além deste fator, acredita-se que o glicosaminoglicano sulfatado possua efeito deturgescente sobre a córnea.

HAMERMAN, SMITH, KEISER e GRAIG, em 1982, estudaram a capacidade do sulfato de condroitina de estimular os condrócitos a produzirem colágeno e proteoglicanos. Também revelaram a inibição da atividade enzimática, como a elastase.

HASSELL, CINTRON, KUBLIN e NEWSOME, no ano de 1983, sugeriram que os proteoglicanos existentes no estroma corneano desempenham papel fundamental na regulação da disposição das fibras colágenas no tecido.

A aplicação do sulfato de condroitina a 20% no humor aquoso causou efeito protetor endotelial em cirurgia oftalmológica além de diminuir a espessura corneana pelo seu efeito hiperosmótico, como pesquisaram MAC RAE, EDELHAUSER, HYNDIUK, BURD e SCHULTZ, em 1983.

PARRY e CRAIG, em 1984, descreveram que os glicosaminoglicanos sulfatados (sulfato de condroitina) atuam como antiinflamatórios inibindo enzimas lisossomiais e proteases, incluindo as beta-glicosaminidases, as beta-glucuronidases, a catepsina e a elastase. Também reduzem o influxo leucocitário, a síntese de prostaglandina E2 e de interleucina 1 e a formação de complementos.

O sulfato de condroitina tem sido utilizado em oftalmologia para o tratamento adjuvante da síndrome do olho seco. Devido 'a sua alta viscosidade e tempo de permanência na superfície ocular, esta substância reduz os sintomas da ceratoconjuntivite seca. Desde 1987, com os estudos de LIMBERG, McCAA, KISSLING e KAUFMAN, o sulfato de condroitina é amplamente usado como lubrificante ocular.

Os glicosaminoglicanos sulfatados inibem enzimas catabólicas como lisozimas, hialuronidases e proteases séricas. Também reduzem a síntese de prostaglandinas E2 e de radicais superóxidos, resultando em efeito antiinflamatório e promovendo aumento do colágeno e do ácido hialurônico no tecido, conforme descreveram BURKHARDT e GHOSH, em 1987

BUCKWALTER, ROSEMBERG e HUNSZIKER, em 1990, descreveram que os proteoglicanos consistem numa cadeia proteica central contendo glicosaminoglicanos sulfatados (GAG-S) ladeado por duas cadeias laterais de condroitina-sulfato e queratina-sulfato. Os GAG-S possuem três subestruturas antigenicamente distintas. Estas são condroitina rica em sulfato, queratina rica em sulfato e regiões unidas por ácido hialurônico. A substância básica tem como

Constituintes primários os glicos aminoglicanos, dos quais a condroitina-4-sulfato e condroitina-6-sulfato são os mais comuns nos animais adultos.

O sulfato de condroitina atua sobre enzimas inibindo o sistema complemento e diminui a atividade da prostaglandina E2, conforme constatou PIPITONE, em 1991.

Em 1992, BASSLEER, HENROTIN e FRANCHIMONT estudaram vários agentes protetores de cartilagem. Entre os principais, o sulfato de condroitina foi testado nesta pesquisa. Verificou-se que o sulfato de condroitina não afetou a secreção basal de prostaglandina E2, produzida pelos condrócitos humanos.

RASHMIR-RAVEN, COYNE, FENWICK, GAUCHAR ANDREWS e DEBOWES, em 1992, mostraram que, em estudos com equinos, os proteoglicanos têm capacidade de eliminar radicais livres e diminuir a liberação de prostaglandina E2. Eles também têm a característica de degradar enzimas lisossomiais, proveniente dos leucotrienos, e de inibir proteases. Os glicosaminoglicanos sulfatados (GAG-S) inibem tanto a via clássica quanto a via alternativa da cascata do complemento na concentração de 0,2 a 0,6 mg/ml. Os GAG-S diminuem a destruição de proteoglicanos e colágeno, estimulam a produção de glicosaminoglicanos de alto peso molecular pelos condrócitos e aumentam a síntese de ácido hialurônico pelas células sinoviais.

Os glicosaminoglicanos sulfatados diminuem a produção de prostaglandina E2 e a síntese de radicais superóxidos, explicando o seu efeito antiinflamatório. Estas substâncias promovem a síntese de colágeno e ácido hialurônico na membrana sinovial e na cartilagem. A córnea e a superfície articular possuem a mesma constituição tecidual e semelhante resposta à injúria, conforme escreve MILLER, em 1996.

WOUK, MICHELOTTO, TIEPPO, LIMA e KOWAL, no ano de 1997, trataram cães com úlceras de córnea indolentes utilizando o sulfato de condroitina. O

sulfato mostrou-se eficaz como alternativa terapêutica em úlceras persistentes e refratárias a tratamentos convencionais.

O sulfato de condroitina consiste no glicosaminoglicano mais comum no corpo humano e é especialmente importante na cartilagem articular. Comprovou-se a eficiência da substância como modulador de doença. Conforme descreveu RONCA, PALMIERI, PANICUCCI e RONCA no ano de 1998, o sulfato de condroitina possui efeito antiinflamatório e regulatório em condrócitos, sinoviócitos e leucócitos. O sulfato demonstrou diminuir a produção de interleucina 1, bloquear a ativação do complemento, inibir competitivamente as metaloproteinases, que promovem degradação de cartilagem.

WRENSHALL, STEVENS, CERRA e PLATT, em 1999, avaliaram o efeito do sulfato de condroitina na produção de citocinas. Não houve incremento na produção de citocinas e prostaglandina E2 pelo sulfato, porém os autores encontraram estímulo da substância na produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

O sulfato de condroitina foi utilizado para tratamento de sinovite aguda em cães. CANAPP, MCLAUGHLIN, HOSKINSON, ROUSH e BUTINE, em 1999, induziram sinovite aguda quimicamente e constataram sucesso terapêutico com o sulfato nestes animais. A inflamação aguda cedeu com o uso da substância e a remodelação da cartilagem ocorreu em menos de 21 dias.

No ano de 2001, os autores HORI, HOSHINO, YAMAZAKI, SEKIGUCHI, MIYAUCHI e HORIE sugeriram a importância do sulfato de condroitina como regulador da atividade anti-inflamatória e da cicatrização de úlceras em mucosa intestinal. Acredita-se que o maior efeito terapêutico desta substância seja o de prevenir a destruição tecidual.

HOUCHBERG e DOUGADOS, em 2001, revelaram que, em diversos testes clínicos, o sulfato de condroitina foi estatisticamente eficaz no tratamento da osteoartrite. Os efeitos colaterais são ínfimos quando comparados aos anti-inflamatórios não esteróides e o tempo de atuação plena da substância variou entre quatro a oito semanas.

MACK, PFIRSTINGER, WEBER, NELSON, WEBER, RUPP, MAK, BRUHL, e SCHLONDORFF, em 2002, concluíram que o sulfato de condroitina atua como importante regulador da resposta celular às citocinas. A substância parece indiretamente intervir na migração de células inflamatórias e citocinas do espaço intravascular ao interstício.

Em 2002, estudou-se a concentração ideal de sulfato de condroitina e de glucosaminoglicanos para se obter o efeito inibitório de citocinas envolvidas no processo inflamatório. ORTH, PETERS e HAWKINS concluíram que a combinação das duas substâncias diminui a síntese de vários mediadores inflamatórios da destruição cartilaginosa. Também constataram que os glicosaminoglicanos, na dose mínima de 0,5 mg/ml, inibiram a secreção de prostaglandina E₂, enquanto somente o sulfato de condroitina, na dose de 0,25 mg/ml, não atingiu este efeito.

Constatou-se que os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) são afetados pelos glicosaminoglicanos sulfatados. A fração 3 dos TIMP (TIMP-3) está localizado somente na matriz extracelular. A atividade do TIMP-3 no espaço perivascular é estimulada pelos glicosaminoglicanos. Inibindo a produção de metaloproteinases pelas células endoteliais, o TIMP-3 diminui indiretamente a produção de fatores angiogênicos, como descreveram TERSARIOL, PIMENTA, CHAGAS e ALMEIDA, em 2002.

RANZANI, CREMONINI, BRANDÃO, RODRIGUES, ROCHA, MANNARINO e CROCCI, no ano de 2004, concluíram que o sulfato de condroitina a

20% foi eficaz na organização cicatricial de úlcera corneana, caracterizando sua ação sobre o tecido composto por colágeno.

2.12 MEIO DE CONSERVAÇÃO DE CÓRNEA

O Optisol® consiste no meio de conservação de córnea composto por várias substâncias, entre as mais importantes destacam-se o dextrano, o sulfato de condroitina a 2,5%, vitaminas e precursores de adenosina trifosfato. Demonstra-se intensa atividade das células endoteliais corneanas quando imersas neste meio de cultura, principalmente ao comparar-se com Dexsol. In vivo não há relatos de toxicidade epitelial ou inflamação intraocular ao se usar o Optisol® topicamente em olhos de coelhos. Os resultados demonstram eficácia na preservação das células endoteliais por pelo menos 2 semanas a 4 ° C, segundo estudos de LINDSTROM, KAUFMAN, SKELNIK, LAING, LASS, MUSC TROUSDALE, REINHART, BURRIS e SUGAR, em 1992.

MEANS, GEROSKI, HADLEY, LYNN e EDELHAUSER, em 1995, ratificaram o fato do Optisol® preservar quase a totalidade de células endoteliais por 21 dias conservando-se a 4 ° C.

No ano de 1996, MEANS, GEROSKI, HERNAULT, GROSSNIKLAUS, KIM e EDELHAUSER verificaram a resistência das células epiteliais da córnea no meio Optisol®. Até 6 dias houve pouca morte celular (menos de 20%). A partir do décimo dia o dano epitelial atingiu 40% das células, demonstrando pouca viabilidade deste tipo celular por períodos longos.

Em 2003, RIECK, VON STOCKHAUSEN, METZNER, HARTMANN e COURTOIS mostraram que a adição de substâncias, como o fator de crescimento de fibroblastos, no meio de conservação de córnea, permite a sobrevivência das células endoteliais por mais tempo.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado no Instituto de Pesquisas Médicas - IPEM do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba e da Faculdade Evangélica do Paraná.

Adotaram-se as Normas de Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2000), normas para referências bibliográficas de títulos e periódicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023) (1989), Nomina Anatômica Veterinária (1983) bem como os Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1994).

A pesquisa preencheu todas as disposições dos artigos 123 e 127 do Código de Ética Médica e orientações do Capítulo XII referente 'a pesquisa médica, sendo liberado seu protocolo pela Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados 45 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos machos de aproximadamente 1500g provenientes do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR.

Os animais foram colocados em alojamentos apropriados e divididos em sete grupos que receberam água e ração específica para a espécie.

3.2.1 Preparo da Amostra

3.2.1.1 Procedimento anestésico

O procedimento anestésico foi realizado para inoculação do corante, para o procedimento de queimadura corneana e para o sacrifício de todos os animais do

experimento. Utilizou-se um funil de plástico com algodão embebido em éter sulfúrico. O funil foi colocado por sobre as narinas aos coelhos até o relaxamento muscular e anestesia dos mesmos. Nos grupos que foi realizado queimadura utilizou-se anestesia tópica com colírio de Cloridrato de proximetacaína 0,5%.

3.2.1.2 Procedimento de queimadura química corneana

Utilizou-se o material absorvente de formato circular (papel filtro) de 15mm de diâmetro que foi embebido por 20 segundos em solução de hidróxido de sódio a 1 N e aplicado sobre a córnea direita dos animais durante 45 segundos (figura 1). Após este período de tempo, retirou-se o papel filtro e irrigou-se a córnea com 20 ml de soro fisiológico a 0,9% (figura 2). Este método foi aplicado aos grupos II, III, IV, V, VI e VII

FIGURA 1 - QUEIMADURA EM CÓRNEA DIREITA DE COELHO UTILIZANDO PAPEL FILTRO PREVIAMENTE EMBEBIDO EM NaOH

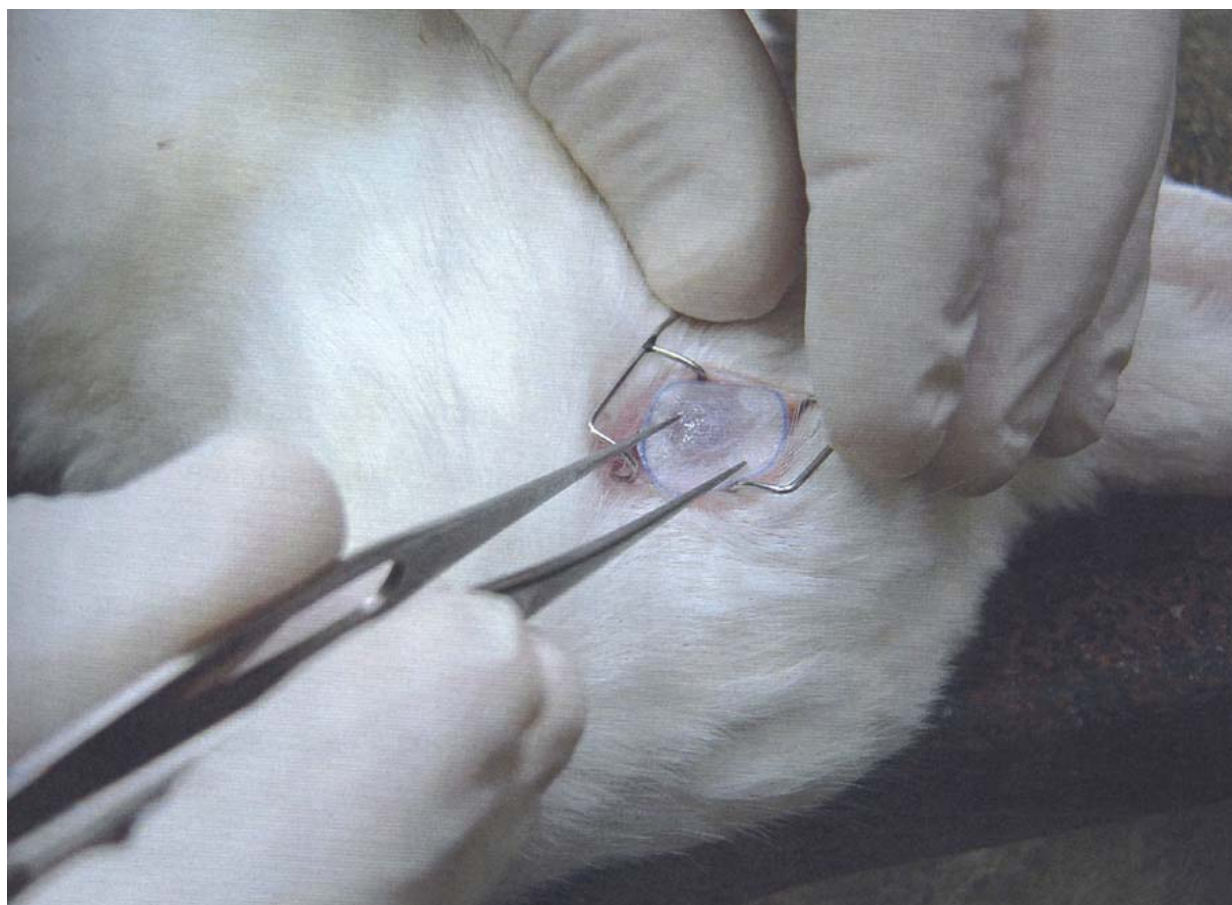


FIGURA 2 - IRRIGAÇÃO COM SORO FISIOLÓGICO A 0,9% APÓS QUEIMADURA COM NaOH NA CÓRNEA DIREITA DE COELHO



3.2.1.3 Grupo I

Primeiramente 10 animais foram utilizados para a determinação da concentração máxima do corante na córnea sem qualquer injúria ou manipulação. Nesta etapa, sacrificaram-se 10 animais depois de dez horas de inoculação do azul de Evans para coleta das amostras (tabela 1). Este método empregado baseou-se na determinação de que, após 10 horas da inoculação do corante, há o pico do seu aparecimento na córnea de coelhos (GEHLEN, 2001).

TABELA 1 - DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS, PERÍODO DE COLETA DE AMOSTRAS E NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS DO GRUPO I

PERÍODO	NÚMERO DE ANIMAIS (COELHOS)	NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
10 horas	10	10
Total	10	10

3.2.1.4 Grupo II

Nesta etapa da pesquisa, 10 animais foram submetidos somente à queimadura corneana do olho direito com hidróxido de sódio a 1 N (NaOH). Os animais ficaram num alojamento apropriado por 5 dias para que posteriormente houvesse o sacrifício (figura 3). Dez horas antes deste procedimento foi inoculado o azul de Evans. Obteve-se dez amostras dos 10 animais componentes deste grupo (tabela 2).

FIGURA 3 - CÓRNEA DE COELHO DO GRUPO II APÓS 5 DIAS DE QUEIMADURA POR NaOH



TABELA 2 - DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NUMERO DE

OLHO DO ANIMAL E	NUMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS	NUMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
Olho direito (somente queimadura)	10	10
	10	10

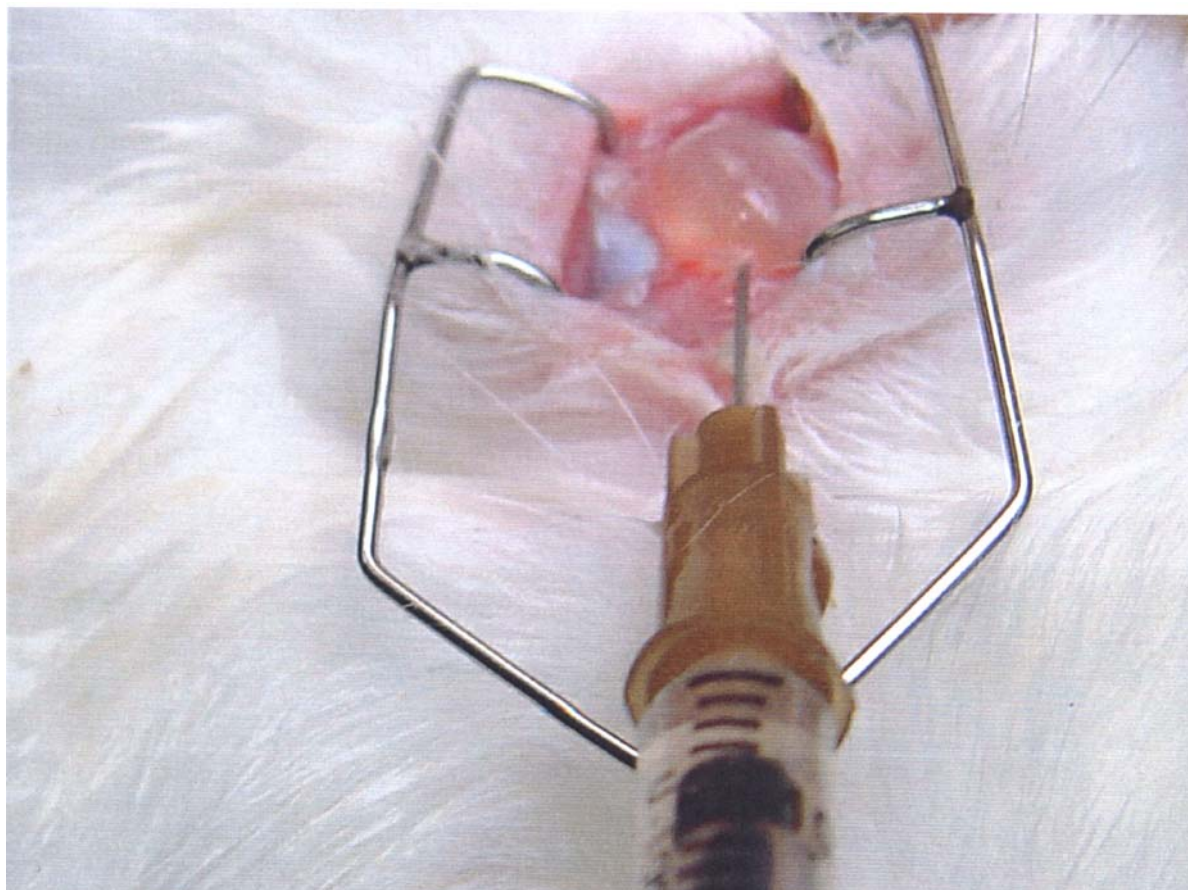
3.2.1.5 Grupo III

Este grupo compôs-se de 05 animais que foram previamente submetidos 'a queimadura química na córnea direita da mesma forma que foi realizado no grupo II. Após 06 horas de queimadura, injetou-se 0,1 ml do preparado de células de membrana amniótica com o meio de conservação de córnea Optisol® via subconjuntival em região bulbar superior do olho direito (local de eleição para aplicação subconjuntival em todos os grupos). Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, 12 e 24 horas após a injúria química (figura 4). Depois de cinco dias da queimadura, 10 horas antes do sacrifício, inoculou-se o corante. Cinco amostras corneanas foram obtidas deste grupo (tabela 3).

TABELA 3 - DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO III

OLHO DO ANIMAL ESTUDADO	NUMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS	NUMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
Olho direito (queimadura + células de membrana com o meio)	05	05
Total	05	05

FIGURA 4 - INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL NOS ANIMAIS DO GRUPO III
APÓS 12 HORAS DE QUEIMADURA QUÍMICA POR ÁLCALI



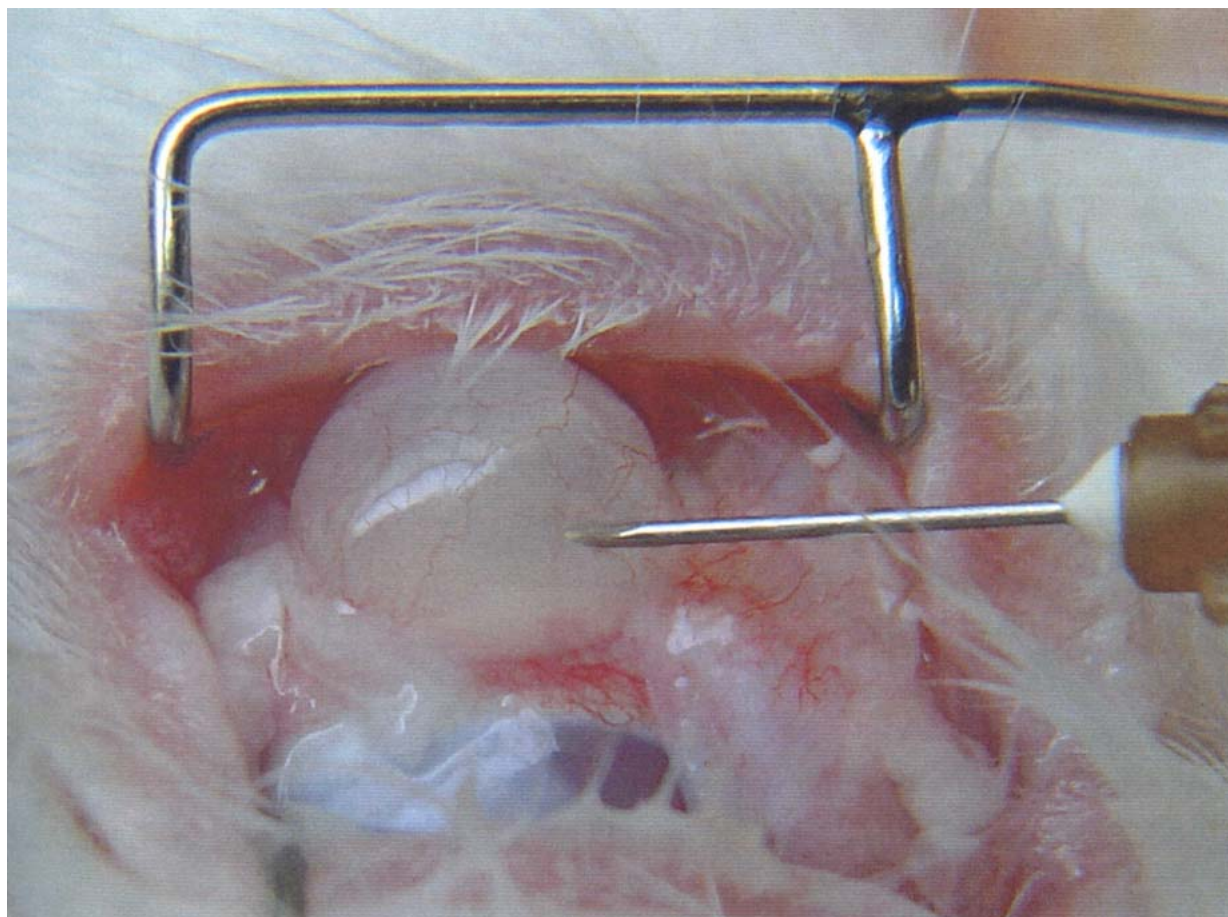
3.2.16 Grupo IV

Assim como no grupo III, os 05 animais que compunham este grupo foram submetidos igualmente ao processo de queimadura com álcali na córnea direita. Periodicamente, depois de 6, 12 e 24 horas do procedimento injetou-se, via subconjuntival, 0,1 ml de acetato de betametasona (Celestone Soluspan®) (figura 5). Os animais, alojados por cinco dias, foram sacrificados depois de 10 horas de inoculação endovenosa do azul de Evans. Cinco córneas foram analisadas neste grupo (tabela 4).

TABELA 4 - DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO IV

OLHO DO ANIMAL E	NUMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS	NUMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
Olho direito (queimadura + corticóide)	05	05
Total	05	05

FIGURA 5 - INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL NOS ANIMAIS DO GRUPO IV APÓS 6 HORAS DE QUEIMADURA QUÍMICA POR ÁLCALI



3.2.1.7 Grupo V

Este grupo constou de 05 coelhos submetidos, igualmente aos demais grupos, à queimadura com NaOH a 1 N. Injetou-se 0,1 ml de soro fisiológico 0,9% no olho direito, via subconjuntival, após 6, 12 e 24 horas da injúria química. Os animais foram deixados em alojamento apropriado também por 5 dias e 10 horas antes do sacrifício foi inoculado o corante azul de Evans via endovenosa. Obteve-se deste grupo cinco amostras corneas dos cinco animais (tabela 5).

TABELA 5 - DEMONSTRATIVO DO NUMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO V

OLHO DO ANIMAL ESTUDADO	NUMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS	NUMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
Olho direito (queimadura +	05	05
Total	05	05

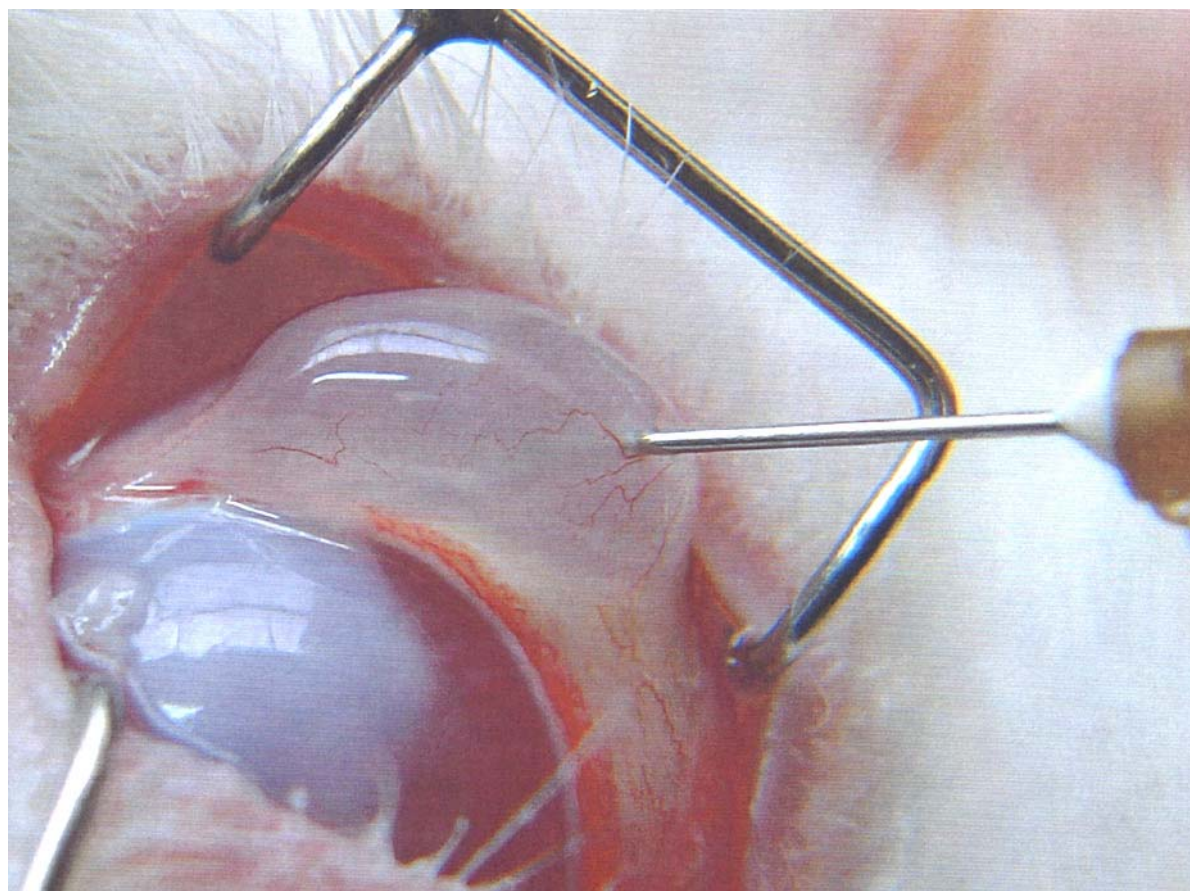
3.2.1.8 Grupo VI

O sexto grupo de estudo compôs-se de 05 coelhos que foram submetidos à queimadura corneana com NaOH a 1 N. Foi injetado, via subconjuntival, 0,1 ml de sulfato de condroitina a 3% (Dunason®) na conjuntiva bulbar superior do olho direito após 6, 12 e 24 horas da injúria química (figura 6). Os animais foram deixados em alojamento apropriado também por 5 dias. Dez horas antes do sacrifício foi aplicado o corante azul de Evans na veia marginal da orelha direita. Obteve-se, deste grupo, cinco amostras corneas dos cinco animais (tabela 6).

TABELA 6 - DEMONSTRATIVO DO NÚMERO DE ANIMAIS E DO NÚMERO DE AMOSTRAS OLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO VI

OLHO DO ANIMAL E	NÚMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS	NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
Olho direito (queimadura + Sulfato de condroitina)	05	05
Total	05	05

FIGURA 6 - INJEÇÃO SUBCONJUNTIVAL NOS ANIMAIS DO GRUPO VI APÓS 12 HORAS DE QUEIMADURA QUÍMICA POR ÁLCALI



3.2.1.9 Grupo VII

O último grupo foi composto de 05 coelhos os quais também foram submetidos à queimadura corneana com NaOH a 1 N. Injetou-se 0,1 ml do meio de conservação de córnea Optisol® no olho direito, via subconjuntival, após 6, 12 e 24 horas da injúria química. Os animais foram deixados em alojamento apropriado também por 5 dias e 10 horas antes do sacrifício foi inoculado o corante azul de Evans via endovenosa. Obteve-se deste grupo cinco amostras corneas dos cinco animais (tabela 7).

TABELA 7 - DEMONSTRATIVO DO NUMERO DE ANIMAIS E DO NUMERO DE AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO AO GRUPO VII

OLHO DO ANIMAL ESTUDADO	NUMERO DE ANIMAIS ESTUDADOS	NUMERO DE AMOSTRAS COLETADAS
Olho direito (queimadura + meio de conservação)	05	05
Total	05	05

3.3 ORGANIZAÇÃO DO MÉTODO

3.3.1 Preparo das Soluções e Reagentes

3.3.1.1 Solução do azul de Evans

Foi preparada uma solução de azul de Evans a 2,5%, MERCK® artigo 3169, em solução fisiológica, num volume suficiente para todo o experimento. A solução resultante apresentava 20 mg/ml, sendo filtrada em membrana esterilizante de 0,22µm, MILLIPORE®, e conservada em temperatura de 4° C.

3.3.1.2 Formamida

Utilizou-se Formamida, MERCK® artigo 9684. 1000 para extração do azul de Evans das amostras corneanas.

3.3.1.3 Álcali

Para queimadura química da córnea foi preparada a solução de hidróxido de sódio a 1 N.

3.3.1.4 Extrato de Membrana Amniótica

A membrana amniótica utilizada foi proveniente da própria espécie, retirada de coelha prenha através de cesárea. Esticou-se a membrana mecanicamente por sobre superfície lisa e desprezou-se a superfície em contato com o córion. Utilizando lâmina de bisturi número 14 raspou-se a porção lisa (âmnio) da membrana por cinco ou seis vezes. O fragmento de tecido adquirido era colocado no meio de conservação Optisol® (meio de conservação de transplante de córnea)

e analisado quanto à celularidade. Cinco membranas foram utilizadas e seus fragmentos de tecido colocados em 3 ml de conservante. A concentração de células, avaliadas por microscopia óptica, variou entre 65 a 75 células por 0,1 ml de conservante.

3.3.1.5 Corticóide

A corticoterapia utilizada via subconjuntival foi de celestone soluspan® adquirida diretamente do frasco original e aplicada sem dissolução. Cada ml da solução contém 3 mg de acetato de betametasona em suspensão e 3,945 mg de fosfato dissódico de betametasona em solução, equivalente a 3 mg de betametasona. Os componentes inativos são: fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio e água.

3.3.1.6 Sulfato de condroitina

O colírio Dunason® é composto de 0,03 g/ml de sulfato de condroitina e veículo constituído de hialuronato de sódio, aprotinina, sorbato de potássio, cloreto de sódio, edetato dissódico e água purificada.

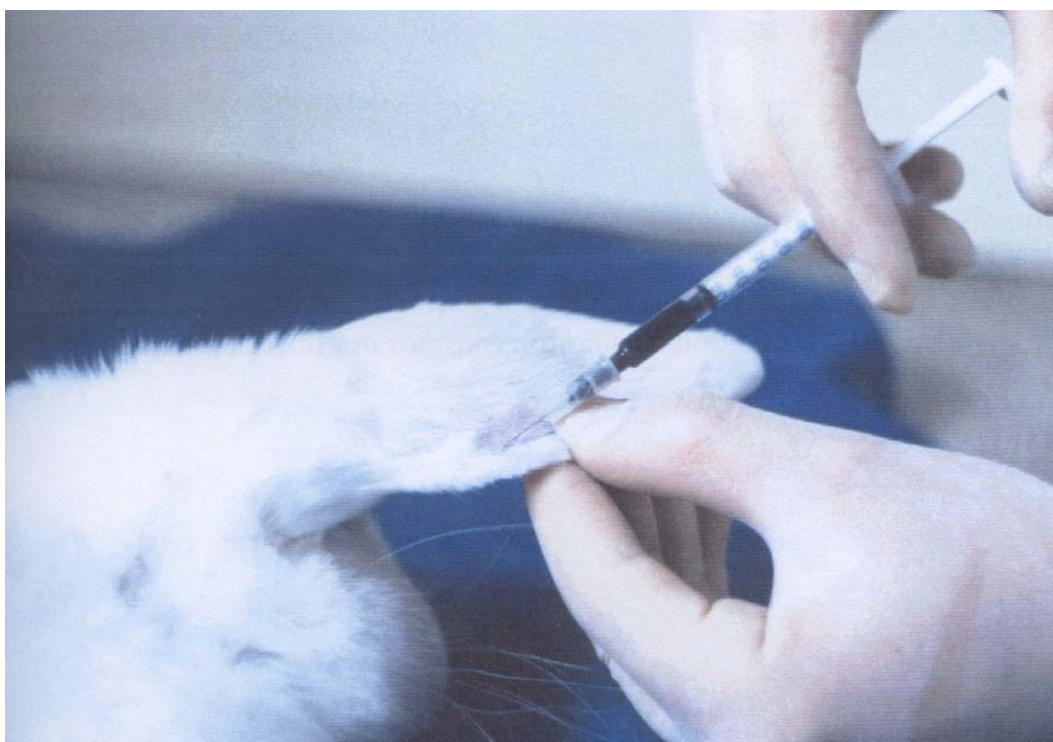
3.3.1.7 Meio de conservação de córnea

O conservante Optisol® - GS CHIRON é um meio de cultura tamponado, estéril, enriquecido com polipeptídeos, dextrano, sulfato de condroitina 2,5%, sulfato de gentamicina 100 ug/ml, sulfato de estreptomicina 200 µg/ml e indicador vermelho de fenol.

3.3.2 Inoculação do Azul de Evans

Inoculou-se o azul de Evans em todos os animais dos grupos I, II, III, IV, V, VI e VII. Os coelhos, sob ação anestésica do éter inalatório, foram submetidos à injeção de azul de Evans na dose de 20 mg/Kg de peso, segundo o método usado por BORDÓN DE CORVALÁN em 1994. A inoculação foi realizada com agulha 13x4,5 mm na veia marginal da orelha direita (figura 7).

FIGURA 7 - DEMONSTRAÇÃO DA INOCULAÇÃO ENDOVENOSA DO AZUL DE EVANS EM VEIA MARGINAL DA ORELHA DIREITA DE COELHO



3.3.3 Injeção de substâncias via subconjuntival

As células provenientes da membrana amniótica com o meio de conservação de córnea, o corticóide, o meio de conservação injetado isoladamente, o soro fisiológico 0,9% e o sulfato de condroitina foram aplicados, via

subconjuntival, na quantidade de 0,1 ml. Procedeu-se a injeção na região conjuntival bulbar superior entre 2 a 4 mm do limbo anatômico do olho direito dos coelhos.

3.3.4 Eutanásia

Nos animais de todos os grupos o sacrifício ocorreu 10 horas após inoculação do corante. Depois da anestesia inalatória com éter sulfurico, todos os animais foram sacrificados com injeção letal endovenosa de 20 ml de ar, inoculado via veia marginal da orelha esquerda.

3.3.5 Coleta das Amostras

Após colocação de um blefarostato (figura 8), procedeu-se a peritomia 360° da conjuntiva. A seguir, as córneas foram extraídas tendo-se o cuidado de retirar 1 mm de margem escleral em todos os animais (figuras 9 e 10).

FIGURA 8 - COLOCAÇÃO DO BLEFAROSTATO ANTES DO INÍCIO DA RETIRADA DA CÓRNEA DE COELHO

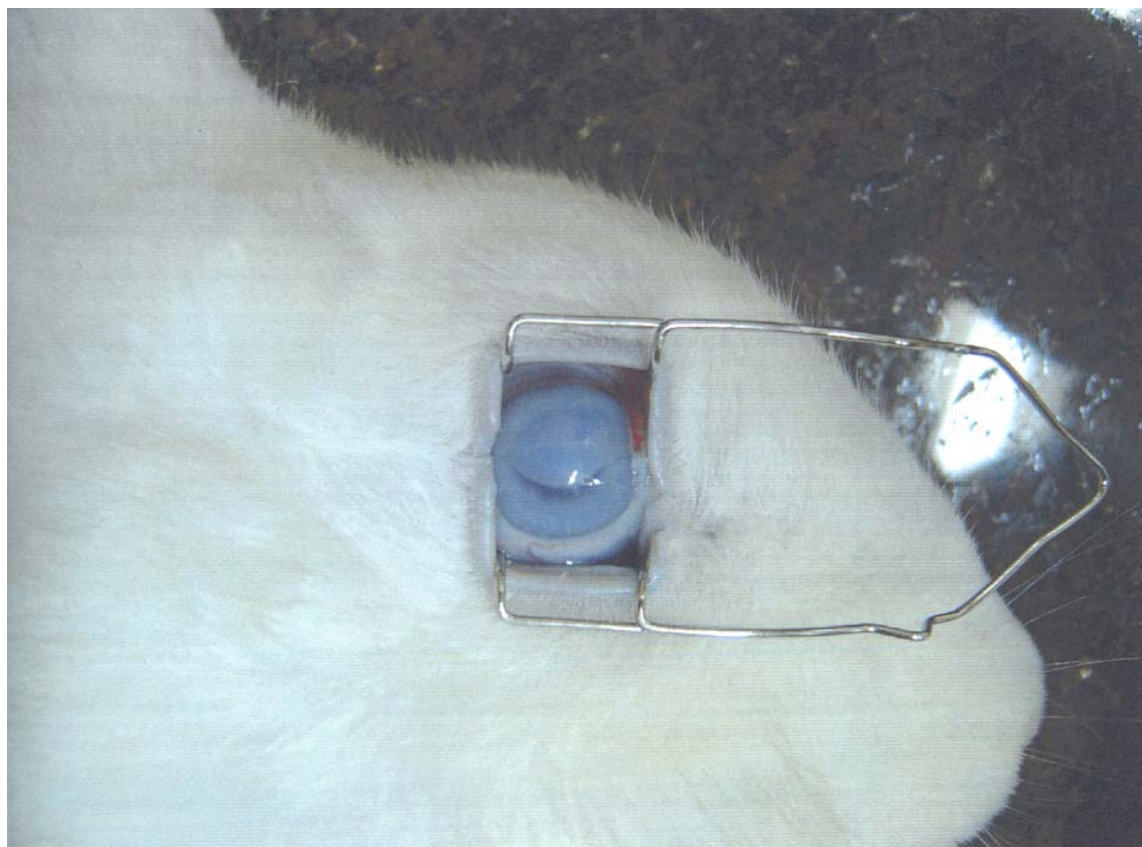


FIGURA 9 - RETIRADA DA CÓRNEA DIREITA DE COELHO - 1

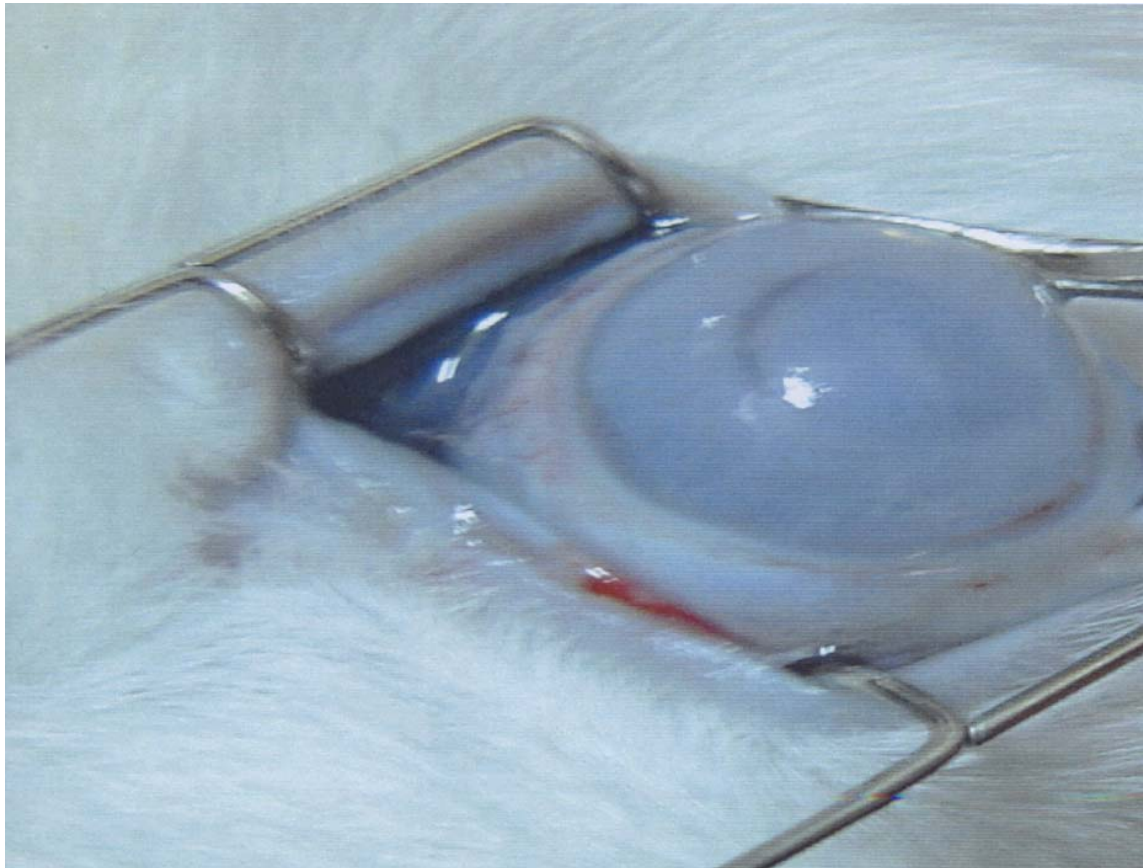
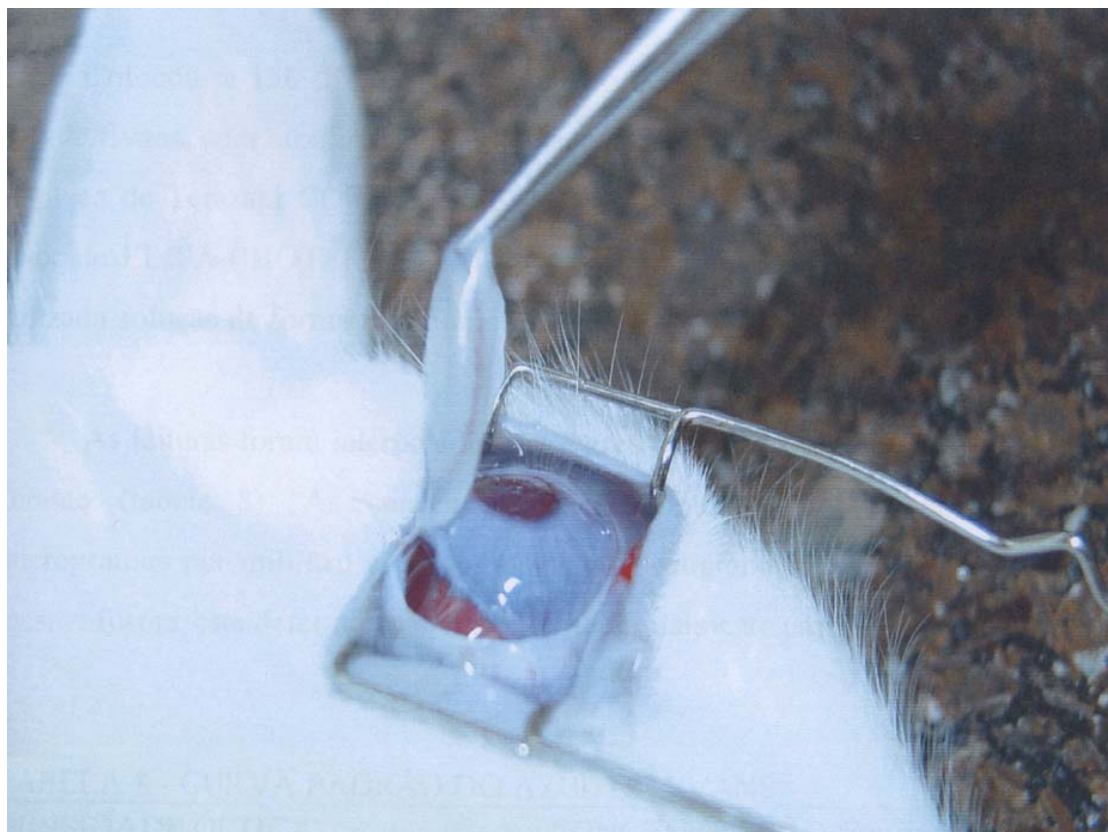


FIGURA 10 - RETIRADA DA CÓRNEA DIREITA DE COELHO - 2



3.3.6 Extração do Corante

Após a retirada da córnea margeada por 1 mm de esclera, a amostra foi pesada em balança eletrônica HELMAC® e imersa em Formamida Merck artigo 9684.1000 na proporção de 4 ml/g. Esta solução foi deixada por 24 horas a 22°C. Após os tubos foram agitados mecanicamente por 15 segundos em agitador PHOENIX® modelo AT 56. Finalmente, o corante extraído pela formamida foi conservado à temperatura constante de -20°C para posterior leitura espectrofotométrica. Este procedimento foi realizado igualmente nos sete grupos.

3.3.7 Determinação Espectrofotométrica do Azul de Evans na Córnea

Colocou-se 150 µl de cada amostra corneana de formamida com o corante azul de Evans, com auxílio de uma pipeta automática GILSON®, em cada orifício da placa de Terazaki CORNING® e realizou-se aferição espectrofotométrica em leitor de ELISA (BIOTEK) com filtro de 650 nm de comprimento de onda. Foi utilizada solução de formamida como branco para o teste.

As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante (tabela 8). As concentrações das amostras foram calculadas em microgramas por mililitro e microgramas por miligrama de tecido corneano. Da mesma forma, esta determinação foi realizada igualmente em todos os grupos.

TABELA 8 - CURVA PADRÃO DO AZUL DE EVANS

DENSIDADE ÓPTICA	CONCENTRAÇÃO (µg/mg)
0,290	16,66
0,214	12,50
0,180	10,00
0,132	8,33
0,093	7,14
0,078	6,25
0,033	5,55
0,027	5,00
r -0,098435	

3.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

3.4.1 Análise de Regressão Linear e Correlação

Para a validação dos resultados espectrofotométricos das amostras

corneanas frente às respectivas curvas padrões de calibração, empregou-se a análise de correlação para obtenção dos coeficientes de correlação (r) (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

3.4.2 Análise de Variância

Os resultados das aferições corneanas do azul de Evans foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de *Kruskal-Wallis* para comparação dos 7 grupos, realizando o teste *dms* para a identificação das diferenças entre os grupos. O nível de significância foi de 5%.

4 RESULTADOS

A concentração média do azul de Evans na córnea dos animais do grupo I, após 10 horas de inoculação do corante, foi de $15,28 \pm 0,09$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Os resultados descritos estão expostos na tabela 9 a seguir mencionada:

TABELA 9 – VALORES DAS CONCENTRAÇÕES DE AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE TECIDO CORNEANO (GRUPO I)

AMOSTRAS	10h.
(CÓRNEAS)	OLHO DIREITO SEM QUEIMADURA
1	15,28
2	15,03
3	15,33
4	15,26
5	15,48
6	15,21
7	15,12
8	15,36
9	15,28
10	15,04
M \pm DP	15,28 \pm 0,09

L = $M \pm (1,96 \times \text{DP} / \sqrt{n})$ onde:

L = Limites da variação, M = Média aritmética dos valores individuais, DP = desvio padrão, n = número de amostras.

Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo I e os grupos II e III ($p < 0,001$). Entre o grupo I e os grupos IV, V, VI e VII não ocorreu esta diferença ($p > 0,05$).

Nas córneas dos olhos do lado direito dos animais do grupo II, as quais foram submetidas à queimadura química, houve aumento da concentração do azul de Evans, com média de $23,74 \pm 2,64$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido (tabela 10).

TABELA 10 - CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO II

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE AZUL DE EVANS
(CÓRNEAS)	OLHO DIREITO COM QUEIMADURA
1	23,32
2	28,48
3	27,47
4	21,25
5	23,14
6	25,16
7	21,44
8	21,44
9	24,75
10	22,98
M \pm D P	$23,74 \pm 2,64$

DP = Desvio Padrão, M = Média.

Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo II e os grupos I, IV, VI e VII ($p < 0,001$). Entre o grupo II e os grupos III e V não ocorreu esta diferença significativa ($p > 0,05$).

Os coelhos do grupo III, os quais sofreram injúria química e injeção de células de membrana amniótica com meio de conservação de córnea (Optisol®), apresentaram média de $23,69 \pm 2,63$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azul de Evans (tabela 11).

TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO III

AMOSTRAS (CÓRNEAS)	CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE AZUL DE EVANS OLHO DIREITO - QUEIMADURA + INJEÇÃO DE CÉLULAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA COM
1	21,44
2	21,25
3	23,14
4	25,16
5	27,47
M \pm DP	23,69 \pm 2,63

DP = Desvio Padrão, M = Média.

Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo III e os grupos I, IV, VI e VII ($p < 0,001$). Entre o grupo III e os grupos II e V não existiu diferença estatística ($p > 0,05$).

O grupo IV, em que houve aplicação de corticóide subconjuntival após queimadura, a concentração média do corante na córnea foi de $15,28 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{mg}$ (tabela 12).

TABELA 12 - CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO IV

AMOSTRAS (CÓRNEAS)	CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE AZUL DE EVANS OLHO DIREITO = QUEIMADURA + INJEÇÃO DE ACETATO DE BETAMETASONA
1	15,26
2	15,48
3	15,21
4	15,12
5	15,33
M \pm DP	15,28 \pm 0,14

DP = Desvio Padrão, M = Média.

Existiu diferença estatisticamente significativa entre o grupo IV e os grupos II e III ($p < 0,001$). Entre o grupo IV e os grupos I, V, VI e VII não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

A concentração média do corante nas córneas dos animais do grupo V (queimadura seguida de injeções subconjuntivais de soro fisiológico 0,9%) foi de $18,21 \pm 2,25$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (tabela 13).

TABELA 13 - CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO V

AMOSTRAS (CÓRNEAS)	CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE AZUL DE EVANS OLHO DIREITO - QUEIMADURA + INJEÇÃO DE SORO FISIOLÓGICO 0,9%
1	19,88
2	16,68
3	15,02
4	20,12
5	19,34
M \pm D P	$18,21 \pm 2,25$

DP = Desvio Padrão, M = Média.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo V e os grupos I, II, III, IV, VI e VII ($p > 0,05$).

No grupo VI, o qual foi realizado queimadura química e posteriormente aplicação de sulfato de condroitina a 3% via subconjuntival, o valor médio do corante na córnea foi de $13,80 \pm 0,26$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido (tabela 14).

TABELA 14 - CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO VI

AMOSTRAS (CÓRNEAS)	CONCENTRAÇÃO OLHO DIREITO = QUEIMADURA + INJEÇÃO DE	EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE AZUL DE EVANS SULFATO DE CONDROITINA
1	13,84	
2	13,81	
3	14,20	
4	13,59	
5	13,55	
M \pm D P	13,80 \pm 0,26	

DP = Desvio Padrão, M = Média.

Houve diferença estatisticamente significante entre o grupo VI e os grupos II e III ($p < 0,001$). Entre o grupo VI e os grupos I, IV, V e VII não ocorreu esta diferença ($p > 0,05$).

A concentração média do azul de Evans nas córneas dos animais do grupo VII, os quais foram submetidos à queimadura seguido de injeção subconjuntival do meio de conservação de córnea Optisol®, foi de $11,83 \pm 0,58 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido (tabela 15).

TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DO GRUPO VII

AMOSTRAS (CÓRNEAS)	CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE AZUL DE EVANS OLHO DIREITO = QUEIMADURA + INJEÇÃO DE OPTISOL®
1	11,59
2	12,28
3	11,32
4	11,35
5	12,61
M \pm DP	11,83 \pm 0,58

DP = Desvio Padrão, M = Média.

Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo VII e os grupos II e III ($p < 0,001$). Entre o grupo VII e os grupos I, IV, V e VI não existiu esta diferença estatística ($p > 0,05$).

As concentrações médias de cada grupo estão especificadas no gráfico 1 e na tabela 16.

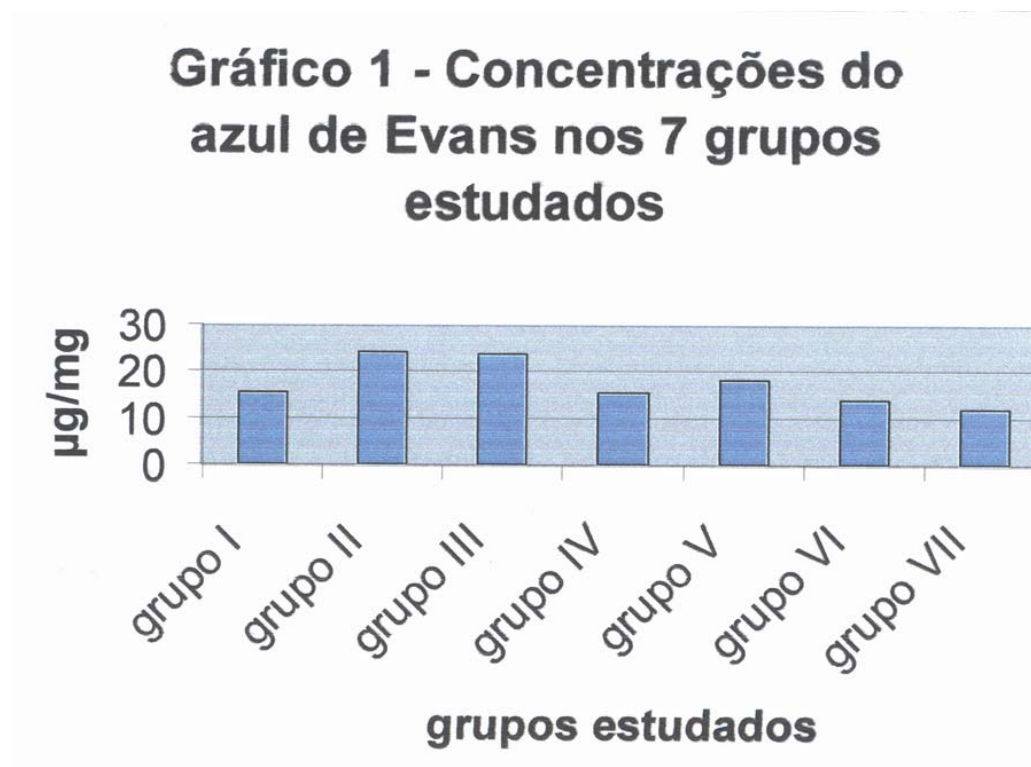


TABELA 16 - CONCENTRAÇÕES DO AZUL DE EVANS EM $\mu\text{g/mg}$ NAS AMOSTRAS CORNEANAS DOS 7 GRUPOS ESTUDADOS

GRUPOS (OLHO DIREITO)	CONCENTRAÇÃO MÉDIA EM $\mu\text{g/mg}$ DE CORANTE (CÓRNEAS)
I	15,28
II	23,74
III	23,69
IV	15,28
V	18,20
VI	13,80
VII	11,83

5 DISCUSSÃO

5.1 GRUPO I

Existem inúmeras técnicas de avaliação da permeabilidade vascular nos tecidos. Pode-se citar a quantificação do conteúdo aquoso, a mensuração do escape de albumina marcado com iodo radioativo, a marcação vascular com carbono coloidal e a inoculação de corantes via endovenosa que se ligam à albumina (CONTRAN et al., 1967; ROBBINS et al., 1991).

Estudos de avaliação da permeabilidade vascular utilizando-se a combinação corante-albumina têm sido relatados desde RAWSON em 1943. O azul celeste de Niágara, o azul celeste de Pontamina 6BX, o azul de Tripan e o T-1824 (azul de Evans) são exemplos desta combinação (BACCARO et al., 1990; BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; BROKAW e WHITE, 1992; FINK et al., 1989; HAAS et al., 1992; HAJAR, 1994; LOUIS et al., 1989; LUNNDBERG e SARIA 1983; MCMAHON et al., 1989; NISHIKAWA et al., 1990; OBATA et al., 1992; REIS et al., 1971; RINKEMA et al., 1984; ROGERS et al., 1988; ROGERS et al., 1989; SARIA et al., 1983; STEELE e WILHELM, 1966; SZABO et al., 1985; SZABO et al., 1986; UKADA et al., 1970; WOODS et al., 1988). O azul de Evans tem sido útil na determinação do volume plasmático, sendo demonstrado em inúmeros trabalhos clínicos e experimentais (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994). O corante apresenta vantagens sobre outros marcadores proteicos, principalmente por não ser radioativo, ter alta solubilidade em água e ser mensurável através de espectrofotometria (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; FREEDMAN e JOHNSON 1969; LEVEEN e FISHMAN, 1947; RAWSON, 1943). Estes aspectos, além do baixo custo e fácil aplicabilidade, foram importantes na escolha do azul de Evans para ser utilizado na avaliação da permeabilidade vascular deste experimento. Existem pesquisas na Faculdade Evangélica do Paraná e na

Universidade Federal do Paraná sobre a utilização deste corante em outros órgãos (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994). Em 1994 foi padronizado um micrométodo espectrofotométrico para quantificar o azul de Evans em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994). Este micrométodo foi igualmente realizado para mensuração do corante neste trabalho. Em 2001 foi quantificado o azul de Evans em córnea de coelhos. O estudo demonstrou que o corante concentra-se mais no tecido após 10 horas de inoculação endovenosa. Além desta constatação, foi averiguado que o azul de Evans pode ser um bom método de quantificação da reação inflamatória na córnea através de experimento com queimadura química (GEHLEN, 2001).

Ao ser inoculado via endovenosa, o azul de Evans primeiramente distribui-se no sistema vascular. Posteriormente, o corante passa para o leito capilar tecidual para finalmente atingir a fase de transferência que pode durar de horas a dias e difere nos vários tecidos. Assim, após 24 horas de inoculação endovenosa de 20 mg de azul de Evans em ratos, o corante pode ser encontrado em 16% no plasma, 30% na pele, 13% no músculo, 12% no fígado e 9% nos ossos (CASTER et al., 1955). Em 1994 estipulou-se em 8 horas como sendo o período de tempo, após inoculação endovenosa de azul de Evans em ratos, de concentração máxima do corante em cólon (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994). Na córnea de coelhos, a concentração foi primeiramente quantificada em 2001. Registrou-se a quantificação do azul de Evans neste tecido em condições normais e na vigência de inflamação (GEHLEN, 2001).

Determinou-se que o período de maior concentração do corante na córnea foi de 10 horas após inoculação endovenosa (GEHLEN, 2001). A partir deste dado, todos os animais sacrificados, em todos os grupos deste estudo, foram submetidos à inoculação endovenosa do corante 10 horas antes do sacrifício. Em córneas normais (grupo I), a concentração média do corante foi de $15,28 \pm 0,09$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Ratificando o estudo de 2001, esta pesquisa obteve semelhante média fisiológica do azul de Evans na córnea, confirmado pelos animais deste grupo de estudo.

5.2 GRUPO II

A queimadura corneana por álcali produz graves lesões na estrutura ocular. Além do epitélio corneano, o álcali penetra no estroma, atinge o endotélio e chega a estruturas do segmento anterior do olho como íris, cristalino e corpo ciliar. Os agentes alcalinos que mais promovem dano ocular são: amónia, cal, soda cáustica e hidróxido de potássio (WAGONER, 1997).

Optou-se pela queimadura corneana com soda cáustica a 1 N devido ao fato deste modelo de trauma apresentar-se como causador de lesão grave às estruturas oculares, principalmente incitando uma rápida resposta inflamatória na córnea e limbo (WAGONER, 1997).

O hidróxido de sódio (NaOH) promove defeito epitelial persistente, úlcera trófica, neovascularização, necrose e até perfuração corneana (THOFT e FRIEND, 1983). Inicialmente o ânion hidróxido (OH) saponifica os ácidos gordurosos das membranas celulares resultando na morte da célula. Os cátions reagem com os grupos carboxílicos (COOH) do colágeno estromal e dos glicosaminoglicanos e a hidratação destes leva a perda da transparência da córnea (MCCULLEY, 1987).

Imediatamente após a queimadura com hidróxido de sódio, observou-se edema importante e perda da transparência do tecido corneano. A córnea persistiu desepitelizada e o edema constante até o quinto dia após o procedimento da queimadura.

O epitélio conjuntival representa a fonte de células para a regeneração epitelial formando um processo de "conjuntivalização" da superfície corneana (SHAPIRO et al., 1981). Com a perda grande de células germinativas ocorre o *pannus* superficial para suprir a isquemia tecidual (GEGGEL et al., 1984).

Ao quinto dia pós-queimadura, antes do sacrifício dos animais, as córneas dos olhos direitos já apresentavam processo de neovascularização superficial periférica com delgados vasos sanguíneos provenientes da região limbar.

A inflamação possui sinais característicos de calor, rubor, tumor, dor e perda da função. O calor e o rubor são resultados do aumento da microcirculação em torno da área lesada. Proteínas, células do plasma e líquido extravasado dos vasos sanguíneos ao tecido extravascular identificam o edema no processo inflamatório (WILHELM, 1982).

Quando há queimadura corneana imediatamente instala-se o edema e a hiperemia conjuntival pericorneana, como o observado no experimento.

A injúria tissular aguda causa alterações no fluxo vascular, no calibre dos vasos, na permeabilidade vascular e na exsudação leucocitária (GUYTON, 1976). A queimadura induzida neste estudo teve por objetivo causar o processo inflamatório agudo para que as alterações da permeabilidade vascular pudessem ser melhor avaliadas.

Em condições fisiológicas, não há passagem de proteínas plasmáticas dos capilares ao espaço intersticial. No entanto, na inflamação ocorre esta passagem, estimando-se como sendo de cinco a sete vezes maior do que num vaso normal (GUYTON, 1976). Esta exsudação das proteínas causou, após injúria provocada nas córneas dos animais dos grupos II, III, IV, V, VI e VII, o edema imediato do tecido. Provavelmente este edema foi mantido pelo aumento da permeabilidade vascular dos vasos perilímbicos. Neste trabalho optou-se pela retirada de tecido corneano margeado por um milímetro de tecido escleral em função da presença de capilares limbares que estão envolvidos nas alterações exsudativas relacionadas a reações inflamatórias.

Portanto, a formação do exsudato é causada pelo aumento da pressão hidrostática, pelo aumento do fluxo sanguíneo e pelas alterações na permeabilidade da parede vascular (GUYTON, 1976). O incremento desta mudança no padrão vascular foi mensurado nesta pesquisa devido ao complexo que se formou entre o azul de Evans e a albumina.

A quantificação do fluxo transcapilar tecidual tem valor na avaliação da exsudação plasmática em vigência de reações inflamatórias, traumas ou infecções,

pois são estas, causas incontestáveis de aumento da permeabilidade capilar (GUYTON 1976).

A revisão da literatura oferece métodos quantitativos para aferir alterações da permeabilidade capilar como a dosagem de catabólitos do ácido araquidônico (SIMONS et al., 1983; SHARON e STENSON, 1985; VILASECA et al., 1990), sendo que, para esta finalidade, requer-se considerável implementação laboratorial. O método utilizado neste estudo obteve os valores de referência do momento máximo de fluxo transcapilar do corante de azul de Evans nas córneas (GEHLEN, 2001). Poderá ser utilizado em outros modelos experimentais correlacionados, aos moldes de outros autores (BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994).

O azul de Evans foi quantificado em diversos estudos para avaliação da permeabilidade vascular alterada. Após lesões inflamatórias de pele em coelhos, pelo método de colorimetria, autores constataram aumento da concentração do corante nestas lesões devido ao aumento da exsudação de proteínas plasmáticas (UKADA et al., 1970). Mediadores químicos da inflamação e injúrias com lesão vascular direta são exemplos de aumento do fluxo transcapilar. A quantidade de albumina que extravasa aos tecidos não é significativa em situações fisiológicas, mas o extravasamento é importante devido a alteração da permeabilidade capilar (GUYTON, 1976; BERNAUER, 1980; BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994). Portanto, o azul de Evans, combinado com a albumina, sofre deslocamento do espaço intravascular em direção ao extravascular e deposita-se no interstício do tecido, como foi constatado nesta pesquisa.

Autores revelam que a alteração da permeabilidade capilar pode ser de origem neurogênica, por exemplo, após estímulo vagal (LUNDBERG e SARIA, 1983). Também pode ocorrer após doses sistêmicas de histamina e endotoxina, demonstrando a origem hormonal da alteração vascular (FREEDMAN e JOHNSON, 1969). Além destas experiências, a literatura ainda relata pesquisas com nistatina, BCG e leucotrienos (BACCARO et al., 1990; OBATA et al., 1992).

Em todos os experimentos, utilizou-se o azul de Evans para avaliar o processo de aumento da permeabilidade vascular.

Neste estudo, as córneas queimadas dos animais do grupo II demonstraram média de $23,74 \pm 2,64$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ do corante. Este dado revela maior concentração do corante nas córneas que sofreram injúria tissular em relação às córneas não queimadas do grupo I ($p < 0,001$).

Observou-se, através da mensuração quantitativa do corante azul de Evans, que a córnea, ao ser submetida ao processo inflamatório, sofre exsudação importante dos vasos perilímbicos.

Ressalta-se que, os estudos utilizando o azul de Evans são adequados para o nosso meio e que a quantificação do corante pode determinar a intensidade *da reação inflamatória corneana devido à alteração da permeabilidade vascular*.

Por meio dos dados padronizados deste grupo, pode-se estudar a interferência de substâncias que modifiquem a permeabilidade vascular previamente alterada pelo processo inflamatório que, neste caso, foi induzido pela queimadura química na córnea.

5.3 GRUPO III

Ao sofrer queimadura, a córnea reage aumentando sua permeabilidade vascular e liberando várias substâncias pró-inflamatórias. As principais citocinas envolvidas são a interleucina 1, o fator de necrose tumoral, a interleucina 6 e a interleucina 8. Originando-se do ácido araquidônico, as prostaglandinas (principalmente a prostaglandina E2), as prostaciclina, o tromboxano, os leucotrienos e as lipoxinas estão relacionados diretamente à manutenção da inflamação e, conseqüentemente, da injúria tissular (SKARE, 1999).

As prostaglandinas têm sido implicadas no aumento da permeabilidade vascular afetando o endotélio capilar durante o processo inflamatório. No entanto, muitas citocinas, como o fator de necrose tumoral, podem estimular a secreção de prostaglandinas pelas próprias células endoteliais (CHEN et al., 1995). Autores

constatarem que as prostaglandinas causaram e perpetuaram a vasodilatação conjuntival induzindo ao extravasamento de albumina e conseqüentemente levando ao edema local (MEIJER et al., 1996)

A membrana amniótica é composta de um epitélio simples com membrana basal espessa associado a delgado estroma avascular. A membrana amniótica é um excelente substrato para a proliferação de células epiteliais da conjuntiva *in vivo*. A supressão de fatores de crescimento e de células inflamatórias contribuem para a redução da vascularização e inflamação da superfície ocular (TSENG, 2001). Vários autores citam propriedades antünflamatórias da membrana amniótica, além do seu poder de aumentar a diferenciação celular e possuir atividade antibacteriana (MURAIN et al., 2001; ZHOU et al., 2003; ZHOU et al., 2004).

As células do âmnio são epitelióides e apresentam citoplasma repleto de microtúbulos e filamentos (MEEK e DAVIS, 1986). Estas células amnióticas, isoladas e mantidas em cultura, secretam prostaglandina E2 (CASEY et al., 1984). *In vivo*, autores descreveram que fatores estimuladores de granulócitos, interleucina 1 α e β e fator de necrose tumoral α e β aumentaram a produção de prostaglandina E2 pelas células amnióticas (BRY e HALLMAN, 1991).

Evidências implicam as citocinas e fatores de crescimento como responsáveis pelo início do parto na mulher. Mesmo em baixas concentrações, as células do âmnio, quando em contato com citocinas, incrementam a produção de prostaglandina E2 (KNISS et al., 1992). Portanto, o início do parto pode ser representado pela secreção de prostaglandinas pelas células do âmnio, existindo analogia entre inflamação e atividade do miométrio no parto. A similaridade entre parto e resposta inflamatória é reforçada pela ação anti-prostaglandina de alguns antibióticos, utilizados para evitar o parto prematuro (PAVAN et al., 2003).

As células amnióticas, utilizadas neste estudo, injetadas na conjuntiva inflamada pela queimadura corneana, encontram o substrato ideal como interleucinas, fator de necrose tumoral, fatores estimuladores de granulócitos e outras proteínas pró-inflamatórias, para secretarem prostaglandina E2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração média do corante deste

grupo ($23,69 \pm 2,63 \mu\text{g/mg}$) com o grupo II ($p > 0,05$). A associação das células amnióticas com o meio de conservação de córnea Optisol® pode ter modificado este resultado. O meio de conservação possui sulfato de condroitina a 2,5% que supostamente anulou a secreção de prostaglandina pelas células do âmnio.

5.4 GRUPO IV

Os corticosteróides atuam em diversas fases da resposta inflamatória. No processo agudo, o corticóide provoca vasoconstrição, diminuição da permeabilidade vascular e da diapedese. Portanto o acúmulo de proteínas que migram para fora do vaso sanguíneo diminui, reduzindo significativamente o edema tecidual no uso do hormônio (SKARE, 1999). Após injúria tissular por queimadura química, o uso do esteróide reduz inflamação e evita a perda de mais células caliciformes. No entanto não se deve utilizar a medicação após 7 dias devido 'a sua atividade inibidora da cicatrização e reepitelização corneana e conjuntival (DONSHIK et al., 1978; BRENT e KARCIOGLU, 1991; CHUNG et al., 1998 e SEKUNDO et al., 2002).

A betametasona caracteriza-se por ser um potente glicocorticóide de rápido efeito e ação prolongada. O efeito antiinflamatório deste esteróide deve-se principalmente 'a alteração do trânsito leucocitário (FAUCI et al., 1976). O corticóide pode ser injetado sob a conjuntiva, resultando em maior penetração e efeito, apesar da via tópica (sob a forma de colírio) ser a mais frequentemente utilizada (PLAIN e HEIN, 1979). A literatura demonstra que a cortisona pode afetar a função das células endoteliais, aliando-se ao seu efeito antiinflamatório (FUKUDA et al., 2000).

Nos animais do grupo IV, a média da concentração do corante nas córneas foi de $15,28 \pm 0,14 \mu\text{g/mg}$, semelhante 'aquela encontrada nos animais que não sofreram injúria tissular, representados pelo grupo I ($p < 0,05$). A utilização do corticóide anulou o processo de permeabilidade vascular alterado pela queimadura

química, evidenciado pela concentração fisiológica encontrada neste grupo. Há diferença estatisticamente significativa quando se compara o grupo IV com os grupos II e III ($p < 0,001$). Este dado reforça a atividade antiinflamatória importante imposta pela betametasona.

5.5 GRUPO V

Neste grupo controle, o qual foi injetado soro fisiológico 0.9%, a quantificação média do corante atingiu $18,21 \pm 2,25 \text{ } \mu\text{g/mg}$ de tecido. Não existiram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos: V e I; V e II; V e III; V e IV; V e VI; V e VII ($p > 0,05$).

Provavelmente devido ao baixo número de amostras não houve diferença estatística entre injetar soro fisiológico ou corticóide e entre soro fisiológico ou sulfato de condroitina. Há possibilidade da injeção subconjuntival de soro fisiológico a 0,9% nos olhos queimados ter mecanicamente dificultado o acesso das células inflamatórias na região limbar onde foi injetado.

5.6 GRUPO VI

O sulfato de condroitina consiste no glicosaminoglicano mais comum do corpo humano (BUCKWALTER et al., 1990; RONCA et al., 1998). Esta substância desempenha papel fundamental na regulação da disposição das fibras colágenas na córnea (HASSEL et al., 1983). O sulfato de condroitina possui a capacidade de estimular os condrócitos a produzirem colágeno e proteoglicanos. A literatura também revela propriedades antiinflamatórias do sulfato, como inibição da atividade de várias enzimas. Elastase, beta-glicosaminidases, beta glucuronidases, catepsina, hialuronidases, lisozimas e proteases séricas são exemplos de atividade anti-enzimática (BURKHARDT e GHOSH, 1987; HASSEL et al., 1983; PARRY e CRAIG, 1984; RASHMIR-RAVEN et al., 1992; RONCA et al., 1998).

Autores acreditam que o glicosaminoglicano sulfatado possua efeito deturgescente sobre a córnea (HARRISON et al., 1982; MAC RAE et al., 1983). Neste estudo observou-se que, clinicamente e quantitativamente, havia menos edema corneano e neovascularização após 5 dias de queimadura quando se utilizou o sulfato de condroitina a 3% via subconjuntival.

O sulfato de condroitina apresenta capacidade de reduzir influxo leucocitário, síntese de prostaglandina E2, de interleucina 1 e a formação de complementos (BURKHARDT e GHOSH, 1987; CANNAP et al., 1999; HORI et al., 2001; MACK et al., 2002; MILLER, 1996; ORTH et al., 2002; PARRY e CRAIG, 1984; PIPITONE, 1991; RASHMIR-RAVEN et al., 1992; RONCA et al., 1998). Alguns autores também referem poder antiangiogênico por alteração de metaloproteinases (TERSARIOL et al., 2002). Neste grupo de estudo, a concentração média do corante foi de $13,80 \pm 0,26 \mu\text{g/mg}$ de tecido. Houve diferença estatisticamente significativa quando se compara o grupo VI com os grupos II e III ($p < 0,001$). Confirmou-se o efeito antiinflamatório do sulfato de condroitina através da redução da permeabilidade vascular corneana e provável efeito sobre citocinas.

Alguns estudos demonstram não haver alteração da secreção de prostaglandina E2 quando se usa sulfato de condroitina (BASSLER et al., 1992; WRENSHALL et al., 1999). Apesar deste experimento não ter pesquisado especificamente a secreção de prostaglandina, pode-se considerar que houve redução da permeabilidade vascular favorecendo esta teoria.

A dose inferior a 0,25 mg/ml do sulfato de condroitina não atingiu efeito inibitório sobre a secreção de prostaglandina E2 (ORTH et al., 2002). Corroborando com este estudo, utilizou-se a dose de 0,03 g/ml para efetuar o efeito antiinflamatório encontrado neste grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos VI e I; VI e IV; VI e V; VI e VII ($p > 0,05$).

O glicosaminoglicano sulfatado parece intervir na migração de células inflamatórias e citocinas do espaço intravascular ao interstício (MACK et al., 2002). Torna-se provável esta hipótese quando a permeabilidade vascular,

evidenciada pelo azul de Evans, reduziu-se a níveis fisiológicos neste grupo.

Devido 'a sua alta viscosidade e tempo de permanência na superfície ocular, o sulfato de condroitina (Dunason®) é amplamente utilizado como lubrificante ocular (LIMBERG et al., 1987). Experiências clínicas em animais, como o tratamento de úlcera de córnea (WOUK et al., 1998) e úlcera de mucosa intestinal (HORI et al., 2001) contribuem para o fato da propriedade antiinflamatória e cicatrizante do sulfato de condroitina. Esta pesquisa ratifica, também *in vivo* e em animais, a característica deste proteoglicano.

Os efeitos colaterais do sulfato de condroitina são ínfimos quando comparados a antiinflamatórios não esteróides e esteróides no tratamento da osteoartrite (HOUCHBERG e DOUGADOS, 2001). No período de 5 dias, utilizando a injeção subconjuntival, não se constatou nenhum efeito colateral aparente nos animais deste grupo.

Diversos testes clínicos têm apontado a variação de 4 a 8 semanas de atuação do sulfato de condroitina na forma de administração oral (HOUCHBERG e DOUGADOS, 2001). Neste trabalho, possivelmente pela injeção subconjuntival e proximidade do local da inflamação, em cinco dias constatou-se significativa resposta antiinflamatória.

Novos ensaios clínicos, preferencialmente em humanos, devem ser realizados na confirmação de significativos resultados antiinflamatórios com poucos efeitos colaterais.

5.7 GRUPO VII

O meio de conservação de córnea compõe-se de várias substâncias. Destacam-se o dextrano, o sulfato de condroitina a 2,5%, vitaminas e precursores de adenosina trifosfato. O Optisol® é um dos meios de conservação de córnea mais utilizados e demonstra-se eficaz em preservar células endoteliais vivas por até 21 dias a 4 ° C (LINDSTROM et al., 1992; MEANS et al., 1995). As células epiteliais sobrevivem 6 dias em mais de 80% de sua totalidade (MEANS et al.,

1996).

Optou-se pela realização deste grupo para confirmar a provável eficácia do Optisol® na redução da permeabilidade vascular da córnea após queimadura química devido à existência do sulfato de condroitina a 2,5%. A concentração média do corante neste grupo foi de $11,83 \pm 0,58 \mu\text{g/mg}$ de tecido. Comparando-se este grupo com os grupos II e III, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Como ocorreu redução da concentração do azul de Evans com o uso apenas do meio de conservação de córnea, pode-se deduzir que as células amnióticas possam ter produzido prostaglandina E2 no grupo III e o sulfato de condroitina, ao mesmo tempo, tenha anulado esta produção.

Não existiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos: VII e I; VII e IV; VII e V; VII e VI ($p > 0,05$). Esta constatação reforça o princípio de que o sulfato de condroitina, após queimadura química, reduz a permeabilidade vascular corneana a níveis fisiológicos.

6 CONCLUSÕES

A aplicação de substâncias via subconjuntival, após indução de inflamação aguda por queimadura com álcali em córnea de coelhos, determinou as seguintes conclusões:

- 1) As células amnióticas, em meio de conservação de córnea Optisol®, não alteraram o processo inflamatório corneano.
- 2) O Celestone Soluspan® (acetato de betametasona) reduziu a inflamação.
- 3) O Dunason® (sulfato de condroitina a 3%) diminuiu a reação inflamatória.
- 4) O meio de conservação de córnea Optisol®, quando injetado isoladamente, reduziu a inflamação corneana aguda.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. F.; ELLIES, P.; PIRES, R. T.; TSENG, S. C. Amniotic *membrane transplantation for partial/ limbal stem cell deficiency*. **Br J Ophthalmol.**, Miami, v. 85, p. 567-575, 2001.

BACCARO, M. R.; MARIANO, M.; MAEUCCELLI, B. E. Chronically intlammed tissue activates plasma mediators of vascular permeability. **Brazil J of Med and Biolog Rés.** São Paulo, v. 23, p. 179-185, 1990.

BASSLEER, C.; HENROTIN, Y.; FRANCHIMONT, P. In-vitro evaluation of drugs proposed as chondroprotective agents. **Int J Tissue React.**, Liege, v. 14, p. 231-241, 1992.

BERNAUER, W. Effects of glucocorticosteroids in rats with acute myocardial infarction. **Arch Internat Pharmacod et Therap.**, Ghent, v. 244, p. 86-99. 1980.

BORDÓN DE CORBALÁN, A. C. **Aplicação do micrométodo espectrofotométrico para a determinação de azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos Wistar**. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BOX, G.; HUNTER, W.; HUNTER, J. **Statistics for experimenter an introduction to design date analysis and model building**. 1 ed., New York. John Wiley&Sons, 1978.

BROKAW, J. J.; WHITE, G. W. Calcitonin gene-related peptide potentiates substance P-induced plasma extravasation in the rat trachea. **Lung**, New York, v. 170, p. 85-95, 1992.

BROWN, S. I. et ai. Alkali burns of the córnea. **Arch Ophthalmol.**, Chicago, v. 82, p. 91-94, 1969.

BRY, K.; HALEMAN, M. Synergistic stimulation of amnion cell prostaglandin E2 synthesis interleukin-1, tumor necrosis factor and products from activated human granulocytes. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, Irvine, v. 44, p. 241-245, 1991.

BUCKWALTER, J. A.; ROSEMBERG, L. C.; HUNSZIKER, E. B. Articular cartilage: composition, structure, response to injury and methodos of facilitating repair. In: EWING, J. W. **Articular cartilage and knee joint function: Basic science and artroscopy**. New York. Raven Press, 1990.

BURKHARDT, D.; GHOSH, P. Laboratory evaluation of anti-arthritic drugs as potencial chondroprotective agents. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 17, p. 3-34, 1987.

BURNS, F. R. et al. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, Brookline, v. 30/7, p. 1569-1575, 1989.

CANAPP, S. O.; MCLAUGHLIN, R. M.; HOSKINSON, J. J.; ROUSH, J. K.; BUTINE, A. Scintigraphic evaluation of dogs with acute synovitis after treatment with glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate. *Am J Vet Res.*, v. 60, p. 1552-1557, 1999.

CARVALHO, J. C. Transplante autólogo de conjuntiva no tratamento de queimaduras oculares graves. **Arq Brás Oftal.**, São Paulo, v. 53, p. 167-170, 1994.

CASEY, M. L.; MACDONALD, P. C.; MITCHELL, M. D. Characterization of prostaglandin formation by human amnion cells in monolayer culture. **Prostaglandins.**, Columbus, v. 27, p. 421-427, 1984.

CASTER, W. O.; SIMON, A. B.; ARMSTRONG, W.D. Evans blue in tissues of the rat. **Am J of Physiol.**, Bethesda, v. 183, p. 317-321, 1955.

CHEN, D. B.; YANG, Z. M.; HILSENATH, R.; LÊ, S. P.; HARPER, M. J. Stimulation of prostaglandin (PG) F₂ alpha and PGE₂ release tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha in culture human luteal phase endometrial cells. **Hum Reprod.**, Houston, v. 10, p. 2773-2780, 1995.

CINTRON, C.; COVINGTON, H. I. Proteoglycan distribution in developing rabbit cornea. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Saettle, v. 38, n. 5, p. 675-684, 1990.

CLAUSEN, D. F.; LIFSON, N. Determinations of Evans blue dye in blood and tissues. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 91, p. 11-14, 1956.

CONTRAN, R. S.; SUTER, E. R.; MAJNO, G. The use of colloidal carbon as a tracer for vascular injury. **Vascular Diseases**, Baltimore, v. 4, p. 107-110, 1967.

DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **Br J Ophthalmol.**, London, v. 78, p. 401-408, 1994.

FAUCI, A.; DALE, D. C.; BALLOW, J. E. Glucocorticosteroid therapy: mechanism of action and clinical considerations. **Annals of Internal Medicine**, v. 84, p. 306, 1976.

FINK, S. J.; MASHBURN, J. P.; KOTTKE, B. A.; ORSZULAK, T. A. Evaluation of arterialized vein graft permeability with Evans blue dye and iodine 125-labeled albumin. **Annals of Thorac. Surg.**, New York, v. 48, p. 646-650, 1989.

FREEDMAN, F. B.; JOHNSON, J. Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. **Am J of Physiol.**, Bethesda, v. 16, p. 675-681, 1969.

FUKUDA, K.; TAKEUCHI, H.; NISHIDA, T. A case of noninflammatory corneal edema following anterior-posterior radial keratotomy (Sato's operation) successfully treatment by topical corticosteroid. **Jpn J Ophthäimol.**, Yamaguchi, v. 44, p. 520-523, 2000.

GEGGEE, H. S.; THOFT, R. A.; FRIEND, J. Histology of human conjunctival transplantation. **Córnea**, New York, v. 3, p. 11-15, 1984.

GEHLEN, M. L. **Avaliação espectrofotométrica do azul de Evans na reação inflamatória da córnea: estudo experimental em coelhos**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GRAYSON, M. **Enfermidades de Ia Córnea**, 2.ed., Bogotá, Editora Médica Panamericana: 1985.

GREEN, T. P.; JOHNSON, D. E.; MARCHESSAUET, R. P.; GATTO, C. W. Transvascular flux and tissue accrual of Evans blue: effects of endotoxin and histamine. **J of Laborai and Clin Med.**, Saint Eouis, v. 111, p. 173-183, 1988.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**, 5.ed., Rio de Janeiro, Interamericana: 1976.

HAAS, D. A.; NAKANISHI, O.; MACMILEAN, R. E.; JORDAN, R. C., HU, J. W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Arch of Oral Biol.**, Oxford, v. 37, p. 417-422, 1992.

HAJAR, N. **O uso do azul de Evans para avaliar a permeabilidade vascular na colite induzida com ácido acético a 10% em ratos Wistar**. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

HAMERMAN, D.; SMITH, C.; KEISER, H. D.; GRAIG, R. Glycosaminoglycans produced by human synovial cell cultures collagen. **Rei Rés**, v. 2, p. 313, 1982.

HARRISON, S.E., SOLL, D.B., SHAYEGAN, M. et ai. Chondroitin sulfate A new and effective protective agent for intraocular lens insertion. **Ophthalmology**, New York, v. 89, n. 11, p. 1254-1260, 1982.

HASSEL, J. R., CINTRON, C., KUBLIN, C.; NEWSOME, D. A. Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 222, n. 2, p. 362-369, 1983.

HIRST, J. W.; KENYON, K. R.; FOGLE, J. A. *et al.* Comparative studies of corneal surface injury in the monkey and rabbit. **Arch Ophthalmol.**, Chicago, v. 99, p. 1066-1073, 1981.

HOCHBERG, M. C.; DOUGADOS, M. Pharmacological therapy of osteoarthritis. **Best Pract Rés Clin Rheumatol.**, Baltimore, v. 15, p. 583-593, 2001.

HORI, Y.; HOSHINO, J.; YAMAZAKI, C.; SEKIGUCHI, T.; MIYAUCHI, S.; HORIE, K. Effects of chondroitin sulfate on colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. **Jpn J Pharmacol** Higashiyamato, v. 85, p. 155-160, 2001.

JOHNSON-WINT, B. Autocrine regulation of collagenase production by passaged corneal stromal cells in vivo. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, Brookline, v. 28 (Suppl), p. 230, 1987.

KLEIN, J. **Immunology**, 1.ed., Massachusetts, Blackwell Scientific Publications: 1991.

KNISS, D. A.; ZIMMERMAN P. D.; FERTEL R. H.; IAMS, J. D. Proinflammatory cytokines interact synergistically with epidermal growth factor to stimulate PGE2 production in amnion-derived cells. **Prostaglandins.**, Columbus, v. 44, p. 237-244, 1992.

LEVEEN, H. H.; FISHMAN, W. H. Combination of Evans blue with plasma protein: its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. **Am J of Physiol.**, Bethesda, v. 26, p. 26-33. 1947.

LIMBERG, M.B., McCAA, C., KISSLING, G. E.; KAUFMAN, H. E. Topical application of hyaluronic acid and chondroitin sulfate in the treatment of dry eyes. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 103, n. 2, p. 194-197, 1987.

LINDERKAMP, O.; MADER, T.; BUTENANDT, O.; RIEGEL, K. P. Plasma volume estimation in severely ill infants and children using a simplified Evans blue method. **Europ J of Pediatr.**, Berlin, v. 125, p. 135-141, 1977.

LINDSTROM, R. L.; KAUFMAN, H. E.; SKELNIK, D. L.; LAING, R. A.; LASS, J. H.; MUSC TROUSDALE, M. D.; REINHART, W. J.; BURRIS, T. E.; SUGAR, A. Optisol corneal storage médium. **Am J Ophthalmol.**, Minneapolis, v. 114, p. 345-356, 1992.

LOUIS, S. M.; JAMIESON, A.; RUSSEL, N. J. W.; DOCKRAY, G. J. The role of substance P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat. **Neuroscience**, Oxford, v. 32, p. 581-586, 1989.

LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea. **Acta Physiol Scand.**, Oxford, v. 115, p. 521-523, 1982.

LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. **Nature**, London, v. 302, p. 251-253, 1983.

MACK, M.; PFIRSTINGER, J.; WEBER, C.; NELSON, P. J.; WEBER, K. S.; RUPP, T.; MA, K.; BRUHL, H.; SCHLONDORFF, D. Chondroitin sulfate A released from platelets blocks RANTES presentation on cell surfaces and RANTES-dependent firm adhesion of leukocytes. **Eur J Immunol** Munich, v. 32, p. 1012-1020, 2002.

MAC RAE, S. M.; EDELHAUSER, H. F.; HYNDIUK, R. A.; BURD, E. M.; SCHULTZ, R. O. The effects of sodium hyaluronate, chondroitin sulfate, and methylcellulose on the corneal endothelium and intraocular pressure. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 95, n. 3, p. 332-314, 1983.

MCCULLEY, J. P. **The Cornea: Scientific Foundation and Clinical Practice**, 2.ed., Boston, Little, Brown and Co.: 1987.

MCLEAN, I. W. BURNIER, M. N.; ZIMMERMAN, L. E.; JAKOBIEC, F. A. **Tumors of the eye and ocular anexa**, 3.ed., Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, Inc.: 1994.

MCMAHON, S. B.; LEWIN, G. R.; ANAND, P.; GHATEL, M. A.; BLOOM, S. R. Quantitative analysis of peptide levels and neurogenic extravasation following regeneration of afferents to appropriate and inappropriate targets. **Neuroscience**, Oxford, v. 33, p. 67-73, 1989.

MEANS, T. L.; GEROSKI, D. H.; HADLEY, A.; LYNN, M. J.; EDELHAUSER, H. F. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. **Arch Ophthalmol.**, Georgia, v. 113, p. 805-809, 1995.

MEANS, T. L.; GEROSKI, D. H.; L'HERNAULT, N.; GROSSNIKLAUS, H. E.; KIM, T.; EDELHAUSER, H. F. The corneal epithelium after Optisol-GS storage. **Cornea.**, Georgia, v. 15, p. 599-605, 1996.

MEEK, W. D.; DAVIS, W. L. Fine structure and immunofluorescent studies of the Wish cell line. **In Vitro Cell Dev Biol.**, New York, v. 22, p. 716-724, 1986.

MEIJER, F.; TAK, C.; VAN HAERINGEN, N. J.; KIJLSTRA, A. Interaction between nitric oxide and prostaglandin synthesis in the acute phase of allergic conjunctivitis. **Prostaglandins**, Amsterdam, v. 52, p. 43-446, 1996.

MILLER, W. W. Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs. **Veterinary Medicine**, Kansas City, v. 91, n. 10, p. 916-922, 1996.

MOREIRA, H. Treatment of experimental *Pseudomonas* keratitis with cicloxygenase and lipooxygenase inhibitors. **Ophthalmol.**, Philadelphia, v. 98, p. 1693-1697, 1991.

MURAINÉ, M.; DESCARGUES, G.; FRANCK, O.; VILLEROY, F.; TOUBEAU, D.; MENGUY, E.; MARTIN, J.; BRASSEUR, G. Amniotic membrane graft in ocular surface disease. Prospective study with 31 cases. **J Fr Ophtalmol**, Paris, v. 24, p. 798-812, 2001.

NISHIKAWA, M.; IKEDA, H.; FUKUDA, T.; SUZUKI, S.; OKUBO, T. Acute exposure to cigarette smoke induces airway hyperresponsiveness without airway inflammation in Guinea pigs. **Respirai Dis.**, Golnik, v. 142, p. 177-183, 1990.

NOBLE, R. P.; GREGERSEN, M. L.; PORTER, P. M.; BUCKMAN, A. Blood volume in clinical shock.. Mixing time and disappearance rate of T-1824 in normal subjects and in patients in shock; determination of plasma volume in man from 10 minute sample. **J of Clin Investigai.**, New York, v. 25, p. 158-171, 1946.

OBATA, T.; KOBAYASHI, T.; OKADA, Y.; NAKAGAWA, N.; TERAWAKI, T.; AISHITA, H. Effect of a peptide leukotriene antagonist Ono-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized Guinea pigs. **Life Sciences**, Oxford, v. 51, p. 1577-1583^ 1992.

ORTH, M. W.; PETERS, T. L.; HAWKINS, J. N. Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine and chondroitin sulfate. **Equine Vet J Suppl.**, East Lansing, v. 34, p. 224-229.

PARRY, D. A. D.; CRAIG, A. S. Growth and development of collagen fibrils in connective tissue. In: RUGGERIC, A.; MOTTA, P. M. (Eds.) **Ultrastructure of the connective tissue matrix**. The Haghe, Martinus Nihoff, 1984.

PATTERSON, C. A.; PFISTER, R. R.; LEVINSON, R. A. Aqueous humor pH changes after alkali burns. **Am J Ophthalmol.**, Chicago, v. 79, p. 414-419, 1975.

PAVAN, B.; FIORINI, S.; FERRETTI, M. E.; VESCE, F.; BIONDI, C. Wish cells as a model for the "in vitro" study of amnion pathophysiology. **Curr Drug Targets Inimune Endocr Metabol Disord.**, Ferrara, v. 3, p. 83-92, 2003.

PIPITONE, V. R. Chondroprotection with chondroitin sulfate. **Drugs Experimental and Clinica Research**, Geneva, v. 17, n. 1, p. 3-7, 1991.

PRABHASAWAT, P.; KOSRIRUKVONGS, P.; BOORANAPONG, W.; VAJARADUL, Y. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **J Med Assoc Thai.**, Bangkok, v. 84, p. 705-718, 2001.

PRINCE, J. H.; DIESEN, C. D.; EGLITIS, I. **Anatomy and Histology of the eye and Orbit in Domestic Animals**, 1.ed., Springfield, Charles Thomas Publisher: 1960.

RANZANI, J. J. T.; CREMONINI, D. N.; BRANDÃO, C. V.; RODRIGUES, G. N.; ROCHA, N. S.; MANNARINO, R.; CROCCI A. J. Avaliação do uso tópico de sulfato de condroitina A (CIPROVET®) no tratamento de úlcera de córnea experimental em coelhos. **Medvep**, Curitiba, v. 2, n. 5, p. 51-56, 2004.

RASHMIR-RAVEN, A. M.; COYNE, C. P.; FENWICK, B. W.; GAUGHAN, E. M.; ANDREWS, G. A.; DEBOWES, M. S. Inhibition of equine complement activity by polysulfated glycosaminoglycans. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 87-90, 1994.

RAWSON, R. A. The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. **Am J of Physiol.**, Bethesda, v. 138, p. 708-717, 1943.

REIS, M. L.; OKINO, L.; ROCHA E SILVA, M. Comparativo pharmacological actions of bradykinin and related kinins of larger molecular weights. **Biochem Pharmacol.**, Oxford, v. 20, p. 2935-2946, 1971.

RIECK, P. W.; VON STOCKHAUSEN, R. M.; METZNER, S.; HARTMANN, C.; COURTOIS, A. Fibroblast growth factor-2 protects endothelial cells from damage after corneal storage at 4 degrees C. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.**, Berlin, v. 241, p. 757-764, 2003.

RINKEMA, L. E.; BEMIS, K. G.; FLEISCH, J. H. Production and antagonism of cutaneous vascular permeability in the Guinea pig in response to histamine, leukotrienes and A23187. **J of Pharmacol and Exper Therap.**, Baltimore, v. 230, p. 550-557, 1984.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**, 4. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1991.

ROGERS, D. F.; BELVISI, M. G.; AURSUDKIJ, B.; EVANS, T. W.; BARNES, P. J. Effects and interactions of sensory neuropeptides on airway microvascular leakage in Guinea pigs. **Brit J of Pharmac.**, London, v. 95, p. 1109-1116, 1988.

ROGERS, D. F.; BOSCHETTO, P.; BARNES, P. J. Plasma exsudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in Guinea pigs airway in vivo. **J of Pharmac Meth.**, New York, v. 21, p. 309-315, 1989.

RONCA, F.; PALMIERÌ, L.; PANICUCCI, P.; RONCA, G. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarth Cartil.**, Rome, v. 6, p. 14-21, 1998.

SARJA, A.; LUNDEBERG, J. M.; SKOFITSCH, G.; LEMBECK, F. Vascular protein linkage in various tissues induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol.**, Berlin, v. 324, p. 212-218, 1983.

SELLERS, A. L.; GRIGGS, N.; MARMORSTON, J.; GOODMAN, H. A. Filtration and reabsorption of protein by the kidney. *J of Experim Med.*, New York, v. 100, p. 1-9, 1954.

SHAPIRO, M. S.; FRIEND, J.; THOFT, R. A. Corneal re-epithelization from the conjunctiva. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, Brookline, v. 21, p. 135-142, 1981.

SHARON, P.; STENSON, W. F.; Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. **Gastroenterol.**, Philadelphia, v. 88, p. 55-63, 1985.

SHON, Y. H.; KIM, J. H.; NAM, K. S. Effect of Astragali radix extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in human amnion. **Biol Pharm Bull.**, Kyongju, v. 25, p. 77-80, 2002.

SIMONS, P. M.; SALMON, J. A.; MONCADA, S. The release of leukotriene B₄ during experimental inflammation. **Bioch Pharmacol.**, Oxford, v. 32, p. 1353-1359, 1983.

SKARE, T.L. **Reumatologia: Princípios e Prática**, 1. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1999.

SOLOMON, A.; ROSENBLATT, M.; MONROY, D.; JI, Z.; PFLUGFELDER, S. C.; TSENG, S. C. Suppression of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. **Br J Ophthalmol.**, Miami, v. 85, p. 444-449, 2001.

SPENCER, W. H. **Ophthalmic Pathology: An Atlas and Textbook**, 4. ed., Philadelphia, W.B. Saunders: 1996.

STEELE, R. H.; WILHELM, D. L. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **Brit. J of Experim Pathol.**, London, v. 47, p. 612-623, 1966.

SZABO, S.; BROWN, A.; TRIER, J. S.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increase vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterol.**, Philadelphia, v. 88, p. 228-236, 1985.

SZABO, S.; PIHAN, G.; TRIER, J. S. Alterations in blood vessels during gastric injury and protection. **Scand J of Gastroenterol.**, Oslo, v. 21, (suppl 125), p. 92-99, 1986.

TERSARIOL, I. L. S.; PIMENTA, D. C.; CHAGAS, J. R.; ALMEIDA, P. C. Proteinase activity regulation by glycosaminoglycans. **Braz J Med Biol Rés.**, Mogi das Cruzes, v. 35, p. 135-144, 2002.

THOFT, R. A. Conjunctival transplantation. **Arch Ophthalmol** Chicago, v. 95, p. 1425-1427, 1977

THOFT, R. A.; FRIEND, J. The X, Y, Z, hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, Brookline, v. 24, p. 1442-1443, 1983.

TSAI, R. J.; LI, L. M.; CHEN, J. K. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. **N Engl J Med.**, Taoyuan, v. 343, p.86-93, 2000.

TSENG, S. C. Concept and application of limbal stem cells. **Eye**, London, v. 3, p. 141-157, 1989.

TSENG, S. C.; PRABHASAWAT, P.; BARTON, K.; GRAY, T.; MELLER, D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Arch Ophthalmol.**, Miami, v.16, p. 431-441, 1998.

UKADA, K.; TAKEUCHI, Y.; MOVAT, H. Z. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 133, p. 1384-1387, 1970.

VANE, J. R. **Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research**, New York, v. 2, Raven Press, p. 791-806, 1976.

VILASECA, J.; SALAS, A.; GUARNER, F.; RODRIGUEZ, R.; MALAGELADA, J. R. Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. **Gastroenterol.**, Philadelphia, v. 98, p. 269-277, 1990.

WAGONER, M. D. Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. **Surv Ophthalmol.**, Amsterdam, v. 41, p. 275-313, 1997.

WILHELM, D. L. **Patologia**, 7. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 1982.

WOODS, K. L.; SMITH, L. J.; GRAMAM, D. Y. Intragastric accumulation of Evans blue dye as a method for assesing aspirin-induced acute gastric mucosal injury in humans. **Digest Dis and Sei.**, New York, v. 33, p. 769-773, 1988.

WOUK, A F. P. F., MICHELOTTO, JR. P. V., TIEPPO, T.; LIMA, R.; KOWAL, R. Polysulfated glycosaminoglycan used for the treatment of indolent corneal ulcers in equine patients. **Rivista SIDI**, Parma, anno 4, n. 1, p. 87-90, 1998.

YANOFF, M.; FINE, B. S. **Atlas of Ocular Pathology**, 1. Ed., Saint Louis, C.V. Mosby: 1996.

ZHOU, S.; CHEN, J.; FENG, J. The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. **Chin Med J.**, Guangzhou, v. 116, p. 788-790, 2003.

ZHOU, S.; CHEN, J. Q.; LIU, Z. G.; HUANG, T.; CHEN, L. S. A clinicaï study of amniotic membrane transplantation for severe eye burns at the acute stage. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi.**, Guangzhou, v. 40, p. 97-100, 2004.

ZIESKE, J. D. Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye*, London, v. 8, p. 163-169, 1994.